



Hinc patriam sustinet

Instituto Superior de Agronomia
Universidade Técnica de Lisboa

RELAÇÃO ENTRE A COMPOSIÇÃO MINERAL DO VINHO E A OCORRÊNCIA DO AROMA A REDUZIDO

Jaime Miguel Pombo Quelhas

Dissertação para a obtenção do Grau Mestre em
Viticultura e enologia

Orientador: Doutor Manuel José de Carvalho Pimenta Malfeito Ferreira

Co-orientador: Doutora Sofia Cristina Gomes Catarino

Júri:

Presidente: Doutor Jorge Manuel Rodrigues Ricardo da Silva, Professor Associado do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa

Vogais: Doutor Manuel José de Carvalho Pimenta Malfeito Ferreira, Professor Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa

Doutora Sofia Cristina Gomes Catarino, Investigadora Auxiliar do Instituto Nacional de Recursos Biológicos, I.P.

Lisboa, 2011

Resumo

O presente trabalho visa avaliar a incidência do defeito de redução em vários tipos de vinho e o efeito dos tratamentos à base de cobre na sua composição em metais.

Para o efeito, foi realizada uma análise retrospectiva da incidência do defeito entre 2004 e 2010, em vinhos produzidos na adega em estudo. Verificou-se que, os vinhos mais susceptíveis foram os tintos, embora os rosés, cuja produção tem aumentado significativamente nos últimos anos, também tenham mostrado elevadas incidências. Apenas numa base empírica, o defeito a reduzido pareceu estar relacionado com vindimas mais precoces e maior tempo de fermentação.

Em consequência da adição do sulfato de cobre, tendo em vista a resolução do defeito a reduzido dos vinhos, o único metal cuja concentração aumentou significativamente foi o cobre. No entanto, este aumento não alterou o equilíbrio geral dos restantes metais no vinho.

De facto, a análise multi-elementar de metais permitiu distinguir os vinhos analisados em função das uvas de origem, tendo sido possível verificar que esta distinção se manteve inalterada após o tratamento com sulfato de cobre.

Palavras-chave: aroma reduzido; H_2S ; compostos voláteis de enxofre; composição em metais; defeito; vinho;

Abstract

The present work is intended investigate the incidence of defect reduction in the several types of wine and the effect of treatments made with copper metal in their composition.

For this purpose, was made a retrospective analysis of incidence of the defect between 2004 and 2010, in the various types of wine produced in the winery under study. The wines seem more susceptible to be the red, while the rosé, whose production has increased significantly in recent years, also showed high incidences. Merely on an empirical basis, the defect appears be associated with harvest earliest and longer fermentation.

As a result of the addition of copper sulphate, in order to resolving the problem of reduced wines, the only metal whose concentration was significantly increased copper. However, this increase did not change the general balance of the remaining metals in wine. Thus, for the multielement analysis we observed that treatment with copper did not affect the composition of metals in order to prevent a breakdown of samples according to the origin.

Keywords: reduced aroma, H₂S, volatile sulfur compounds, metal composition, defect, wine;

Extended summary

The main cause that is pointed to the appearance of the defect reduction, is the lack of assimilable nitrogen during the fermentation, however there are a wide range of factors that are also listed as possibly responsible for its appearance, such as residues agrochemicals, the excess of sulfur dioxide in the fermentation, the yeast genetic own and also other factors that may induce stress factors in yeast.(Zoecklein, 2008)

The different compounds that transmit sulfur-like off odors are classified according to their boiling point, the light whose boiling point is below 90 ° C and that arise during fermentation, and heavy that have their boiling above 90 ° and are produced by yeasts during and after fermentation and are more difficult to remove compared to previous (Flanzy, 2003).

Currently the winemaker has at your service some techniques and products to minimize and remove the type of defect in the study. As is the case of micro-oxygenation, products made from the remains of yeast, and also some products made of copper.

Study based on data from 2004 to 2010 stands out the red wine, as the species most inclined to the appearance of the defect. this could be due to the reducing conditions that exist during the fermentation. However, it is necessary to say that white wine and rosé also have some susceptibility to reduction.

After the choice of samples that had the best indicators of the defect in question, proceeded to its multi-element analysis. later the samples were treated using copper sulphate, in order to verify that this corrective action, could alter the geographical location based on mineral composition of the wines.

Analyzing statistical data, there is no difference in the mineral balance of the sample, by addiction of copper sulphate. However it turns out that the final quantity of copper, is usually lower, the expected amount. Fact could be explained by oxidation of the compounds responsible for the defect.

Agradecimentos

É necessário evidenciar a amizade, a dedicação, o esforço e profissionalismo de algumas pessoas que me acompanharam, em especial.

- Ao Doutor Manuel Malfeito Ferreira, pelos conhecimentos transmitidos, pela sua compreensão, ajuda e acompanhamento no desenvolvimento deste projecto.

- À Doutora Sofia Cristina Catarino pela sua disponibilidade, pela ajuda excepcional na análise multi-elementar sem ela a realização deste trabalho não teria sido possível.

- Ao Doutor Jorge Manuel Rodrigues Ricardo da Silva pelos conhecimentos, pela ajuda, pela motivação contagiante que o caracteriza.

- Ao Dr. José Luís Oliveira Da Silva pela possibilidade de fazer o mestrado, por todas as oportunidades proporcionadas, pelos conhecimentos e conselhos que me transmitiu.

- Ao Mestre José Manuel Assunção Rodrigues pela amizade que nos une, pela transmissão do gosto pelo vinho e tudo aquilo que o rodeia, pelos conhecimentos partilhados, pelos momentos únicos que vivemos, por tudo aquilo que não se consegue descrever.

- À minha maravilhosa esposa, pela paciência nos momentos de tensão, de stress, pela compreensão, pelo incentivo que me deu em todo o meu percurso, por ser quem é para mim.

- Aos meus pais por sempre me apoiarem, incentivarem e motivarem nos bons e maus momentos que passei.

- À minha irmã e cunhado por me acompanharem, estarem sempre disponíveis e sempre presentes a meu lado.

- Ao meu amigo João Miguel Cavaco pela amizade que temos, pelos conselhos que me transmitiu, pela ajuda que sempre disponibilizou.

- Aos meus amigos Vítor, Vera, António, Sérgio e Hermano com quem tenho o prazer e a sorte de poder trabalhar, por estarem sempre disponíveis para me ajudar em tudo o que necessitei.

- Ao professor Doutor Jorge Cadima pela disponibilidade e ajuda, no tratamento de dados estatístico.

- Ao meu colega e amigo Ricardo Chagas por toda a ajuda prestada no decorrer deste trabalho.

**A todos
“Bem hajam”**

Índice

Resumo	I
Abstract	II
Extended abstract	III
Agradecimentos	IV
Lista tabelas	VIII
Lista figuras	IX
1. Introdução	1
1.1 O problema	
1.2 Moléculas envolvidas e impacto organoléptico	2
1.3 Origem e evolução dos compostos reduzidos de enxofre	3
1.4 Prevenção	6
1.5 Tratamento	7
1.6 Enquadramento e objectivo do trabalho	10
2. Material e métodos	
2.1 Análise dos dados de adega	11
2.1.1 Selecção de amostras	11
2.1.2 Prova organoléptica	12
2.2 Análise multi-elementar	14
2.2.1 Tratamento estatístico de dados	16
3. Resultados e discussão	
3.1 Incidência do defeito	16
3.2 Observações empíricas	19
3.3 Determinação do defeito	20
3.4 Correção do defeito	21
3.5 Composição em metais dos vinhos	22
3.6 Determinação dos elementos com maior peso discriminante	27
3.7 Efeito do tratamento nos metais mais relevantes	28
3.8 Variação do teor em metais após tratamento	31
3.9 Relação entre o cobre adicionado e o teor de cobre final	32

4. Conclusões finais e perspectivas futuras	34
5. Bibliografia	35
Anexos	36

Lista de tabelas

Tabela 1 - Incidência dos defeitos (%) nos vinhos reprovados sujeitos ao concurso “International Wine Challenge” _____	5
Tabela 2 - Compostos reduzidos de enxofre presentes no vinho e respectivos limites de detecção _____	6
Tabela 3 - Factores que afectam a produção de compostos sulfurados, seu diagnóstico e prevenção _____	10
Tabela 4 - Impacto dos tratamentos à base de cobre no vinho _____	11
Tabela 5 - Descrição das substâncias para possíveis tratamento _____	12
Tabela 6 - Descrição dos vinhos analisados _____	14
Tabela 7 - Interpretação da análise sensorial do defeito, após a adição cobre e cádmio _____	15
Tabela 8 - Incidência do problema ao longo dos anos de colheita no vinho branco e respectivo tratamento. _____	19
Tabela 9 - Incidência do problema ao longo dos anos de colheita no vinho rosado e respectivo tratamento _____	20
Tabela 10 - Incidência do problema ao longo dos anos de colheita no vinho tinto e respectivo tratamento _____	21
Tabela 11 - Data de início de cada vindima e média de dias de fermentação para cada tipo de vinho. _____	22
Tabela 12 - Resultados obtidos na prova olfactiva, através da execução do teste de Zoecklein (2001), que permite determinar que tipo de compostos estão presente na amostra _____	23
Tabela 13 - Volume (ml) de solução de sulfato de cobre (concentração 1 g/l) necessários para fazer desaparecer o defeito nos copos de prova (50 ml). _____	24
Tabela 14 - Quantidade de Sulfato de Cobre adicionada a cada amostra (mg/L) para retirar o defeito. _____	25
Tabela 15 - Composição em metais dos vinhos analisados (média de 2 Determinações, CV – coeficiente de variação). _____	26
Tabela 16 - Coeficientes da função de classificação para a modalidade _____	30
Tabela 17 - Resultados da ANOVA (2 factores com interacção) para o Cobre _____	31
Tabela 18 - Comparação das médias obtidas pela ANOVA recorrendo ao teste de <i>Tukey</i> para o Cobre _____	31
Tabela 19 - Quadro resumo da ANOVA 2 factores com interacção, ao Sódio _____	32

Tabela 20 – comparação das médias obtidas na Anova, representadas no quadro anterior recorrendo ao teste de <i>Tukey</i> , para o elemento Sódio _____	32
Tabela 21 - Quadro resumo da ANOVA 2 factores com interacção, ao Titânio _____	32
Tabela 22 – comparação das médias obtidas na Anova, representadas no quadro anterior recorrendo ao teste de <i>Tukey</i> , para o elemento Titânio _____	33
Tabela 23 – Quantidade de Cobre adicionado às amostras e a quantidade final obtida. _____	35

Lista de figuras

Figura 1 - Factores que afectam a produção de compostos sulfurados pelas leveduras durante a fermentação _____	8
Figura 2 - Representação gráfica das duas primeiras componentes principais resultantes da Análise de Componentes Principais utilizando os 30 elementos da composição em metais das amostras analisadas. _____	29
Figura 3 - Representação gráfica das duas primeiras componentes principais resultantes da Análise de Componentes Principais utilizando os 30 elementos da composição em metais das amostras analisadas, tendo como objectivo de diferenciar as modalidades tratado e não tratado. _____	33
Figura 4 - Variação do teor de Cobre antes e após o tratamento _____	34
Figura 5 - Variação do teor de Titânio nas amostras, antes e após o tratamento ____	35
Figura 6 - Variação do teor de Sódio nas amostras, antes e após o tratamento _____	36
Figura 7 – Relação entre a quantidade final prevista de cobre após tratamento e a quantidade final real obtida _____	38
Figura 8 – Correlação entre a quantidade final prevista de cobre após tratamento e a quantidade final real obtida _____	39

1. INTRODUÇÃO

1.1 O problema

A qualidade dos vinhos pode ser afectada por uma série de moléculas responsáveis por defeitos de aroma e sabor. Um dos principais grupos de compostos é conhecido pelo cheiro a “reduzido” que imprimem aos vinhos, em função da presença de átomos de enxofre na sua molécula.

Actualmente, o número de vinhos afectados representa uma proporção significativa entre os principais defeitos de vinhos. Dados empíricos obtidos relativamente a um universo anual de cerca de 10.000 vinhos, levados a concurso no International Wine Challenge, realizado em Londres, mostram que esta alteração está presente em cerca de 25 a 30% dos vinhos rejeitados pela prova (Tabela 1). E ainda que a avaliação de defeitos de aroma pelos provadores possa ser discutível, a verdade é que o “reduzido” tem uma incidência que o coloca, a par com o “cheiro a rolha”, nos defeitos mais frequentes, nos três anos estudados.

Tabela 1 Incidência dos defeitos (%) nos vinhos reprovados sujeitos ao concurso “International Wine Challenge” (adaptado de Goode e Harrop, 2008).

Defeito	2006	2007	2008
Rolha	27,83	29,68	31,11
Suor de cavalo	10,59	12,82	15,79
Oxidação	24,29	22,88	19,11
Reduzido	29,18	26,53	28,89
Vinhos com defeito	7,1	-	5,88

Este problema parece ser potenciado pela utilização das cápsulas de rosca (screw-cap) como vedante das garrafas, uma vez que reduz fortemente a quantidade de oxigénio que entra em contacto com o vinho, criando um ambiente redutor (Goode e Harrop, 2008).

Desta forma, a procura de soluções para o problema tem vindo a intensificar-se nos últimos anos, de modo a esclarecer a sua origem, prevenir o seu aparecimento e tratar os vinhos afectados.

1.2 Moléculas envolvidas e impacto organoléptico

No vinho podem ser encontrados mais de 100 compostos que têm na sua constituição enxofre, mas só aproximadamente 10 estão presentes em teor, acima do seu limiar de detecção (Zoecklein, 2007). Estes compostos podem ser agrupados em mercaptanos e poli-mercaptanos, possuindo como descritores o cheiro a esgoto, ovos podres, alho e cebola (Tabela 2).

Dentro deste grupo de compostos destaca-se o H_2S pela elevada volatilidade com limiar de percepção de 0,8 $\mu g/L$, sendo esta a molécula mais comum e que confere o aroma a reduzido dos vinhos (Jackson, 2008).

Outra forma de agrupar está relacionada com o seu ponto de ebulição: compostos de baixo peso molecular, com ponto de ebulição abaixo de 90°C; compostos de elevado peso molecular, com ponto de ebulição acima de 90°C (Flanzy, 2003).

Tabela 2 Compostos reduzidos de enxofre presentes no vinho e respectivos limites de detecção (adaptado de Ribéreau-Gayon et al., 2006).

Composto	Limiar de percepção ($\mu g/L$)	Descritores	Concentração em vinho ($\mu g/L$)		Ponto de ebulição (°C)
			Sem defeito	Com aroma reduzido	
Sulfureto de hidrogénio	0,8	Ovos podres	0,3	16,3	- 61
Metil-mercaptano	0,3	Couve podre, couve cozida, borracha queimada, água estagnada	0,7	5,1	6
Etil-mercaptano	0,1	Cebola, fósforo queimado, terra	0	10,8	35
Sulfureto de dimetilo	5	Marmelo, trufa	1,4	2	35
Dissulfureto de carbono		Borracha	1,7	2,4	46
Metionato de etilo	300	Metálico	1	2	90
Metionol	1200	Couve cozida	838	1776	90
Sulfureto de dietilo	0,9	Éter, borracha			92
4-Metil-tiol-butanol	80	Terroso	36	35	96
Dissulfureto de dimetilo	17	Milho cozido, couve cozida, espargos, vegetal	0	2	109
2-Mercaptano-etanol	130	Borracha queimada	72	124	157
Dietil - dissulfureto	4,3	Alho, fósforo queimado, borracha			151
2-Metil-tiol-etanol	250	Couve-flor	56	80	170
Benzotiazol	50	Borracha	2	11	234

Os mercaptanos, estruturalmente, são caracterizados por serem compostos organosulfurados com uma estrutura molecular simples, que se precipitam na presença de sais de mercúrio (Ribéreau-Gayon, et al., 2006). São constituídos por um hidrocarbono e grupo com função tiol (-SH). A maioria são parecidos com os álcoois, residindo a diferença na presença do grupo tiol (-SH) em substituição do grupo hidroxilo (-OH).

Ainda, dentro deste grupo destacam-se o etil-mercaptano e o metil-mercaptano pelas suas características sensoriais e reduzidos limiares de detecção.

Por sua vez, os poli-mercaptanos, ou tioésteres, têm na sua estrutura um ou mais átomos de enxofre ligados entre dois carbonos. O seu composto mais frequente é o sulfureto de dimetilo que acima do limiar de percepção contribui com odores desagradáveis. No entanto, quando presente em baixa concentração, contribui positivamente com aromas de espargos, milho e melão. Ainda, dentro deste grupo podemos encontrar, moléculas como o dissulfureto de dimetilo e de dietilo, que por si só não apresentam relevância aromática. No entanto, em ambiente redutor podem dar origem a mercaptanos, que são fortemente penalizadores do aroma dos vinhos (Jackson, 2008).

1.3 Origem e evolução dos compostos reduzidos de enxofre

O aparecimento dos compostos reduzidos de enxofre em vinhos depende de vários factores. São eles: o tipo de levedura, temperatura de fermentação, dimensão dos depósitos, cinética de fermentação, turvação do mosto, o teor de azoto assimilável, teor de vitaminas, sulfatos, sulfitos e resíduos de pesticidas, ou ainda, as concentrações elevadas de iões metálicos (Boulton et al., 2002).

Durante o esmagamento das uvas podem também surgir moléculas (dissulfureto de carbono - CS_2 e sulfureto de carbono - COS), em consequência da presença de eventuais pesticidas presentes nas uvas, no entanto a sua concentração tende a diminuir no decorrer da fermentação (Jackson, 2008).

De todos estes factores, aquele que demonstra ser a principal causa do aparecimento destes compostos, advém da actividade fermentativa das leveduras, dependendo da estirpe e das condições nutricionais no decorrer da fermentação alcoólica (Fig. 1). Com efeito, as leveduras necessitam de uma fonte de enxofre de forma a sintetizarem aminoácidos contendo enxofre e outros metabolitos essenciais (metionina e cisteína) (Fugelsang e Edwards, 2007).

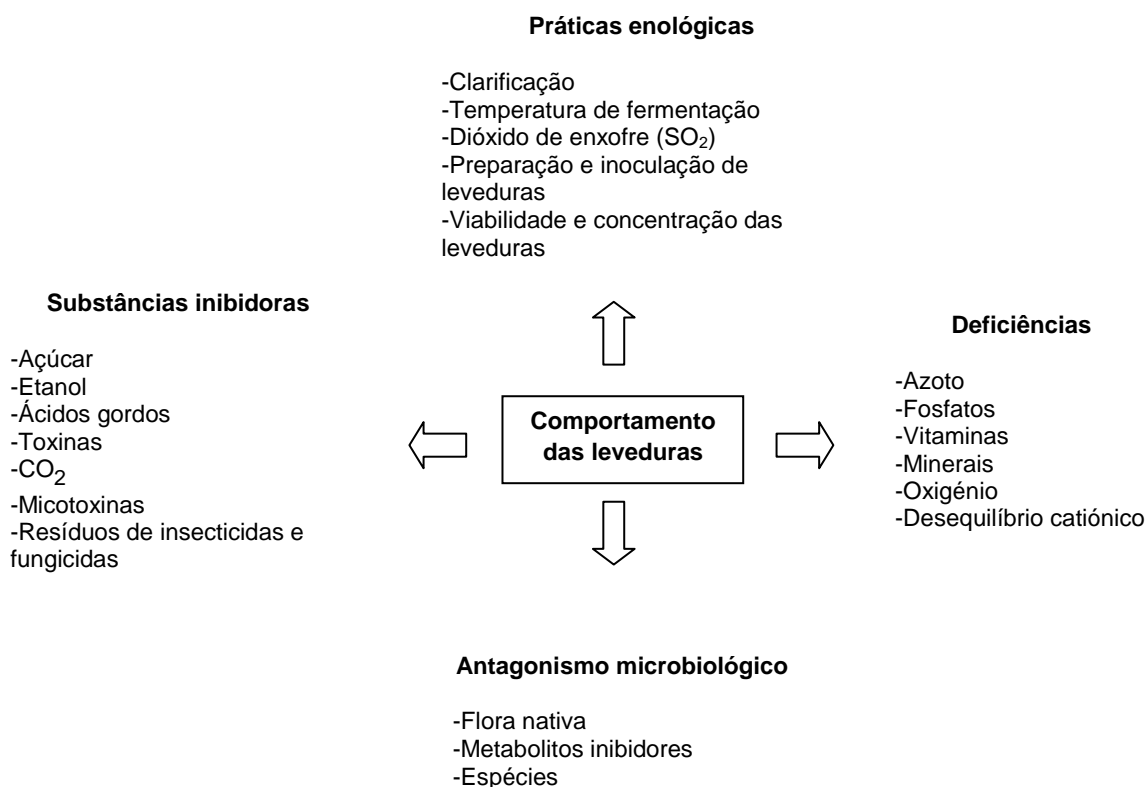


Figura 1 Factores que afectam a produção de compostos sulfurados pelas leveduras durante a fermentação (adaptado de Zoecklein et al., 2001).

Zoecklein (2007) defende que os compostos sulfurados de baixo peso molecular são formados durante e após a fermentação, enquanto os compostos de elevado peso molecular só são produzidos pelas leveduras no decorrer da fermentação alcoólica. Este tipo de compostos mantém-se estável no vinho após a fermentação, sendo difícil de remover uma vez que o seu ponto de ebulição é muito elevado.

Por outro lado, estudos recentes apontam que a quantidade de H₂S residual no vinho depende mais da etapa de fermentação onde é produzido, do que da quantidade que é produzida. Isto porque, o H₂S produzido a seguir à fase exponencial de fermentação (< 50 a 100 g/L), tem maior propensão para ficar residual, do que aquele que é produzido nas primeiras etapas de fermentação (Ugliano *et al.*, 2009).

Sendo um produto intermédio no processo de redução dos sulfatos, o H₂S é uma molécula que contém enxofre, essencial para o crescimento e funcionamento das células. Quando por via do metabolismo surge uma procura de cisteína e metionina, tem início o processo da redução de sulfatos e caso se verifique carência de azoto intracelular, o processo continua, produzindo H₂S que não será incorporado nos aminoácidos, dada a carência referida de azoto, sendo então o excesso libertado para o meio (Zoecklein, 2007).

O maior problema que advém da presença H_2S residual no vinho, é que não sendo tratado ou removido rapidamente, vai desencadear reacções com o acetaldeído, dando origem a compostos como, por exemplo, o etil-mercaptano (Jackson, 2008). Por sua vez, o mesmo composto (etil-mercaptano) ao combinar-se com outra molécula igual, vai produzir dissulfureto de dietilo que possui características olfactivas com descritores de aromas mais intensos, sendo por isso facilmente detectável em menores concentrações.

Este tipo de compostos são normalmente mais difíceis de tratar e remover, dado o seu ponto de ebulição mais elevado (Kaiser, 2010). Assim, é possível que um vinho não apresente o defeito no momento do engarrafamento mas, devido ao aumento do poder redutor na garrafa, passe a “reduzido”, indiciando que estamos na presença de metil-mercaptano, que resultou da redução do dissulfureto de dimetilo.

1.4 Prevenção

A actuação de forma preventiva é a melhor estratégia para evitar a presença de compostos reduzidos de enxofre (Tabela 3).

Para o efeito, na vinha, deve evitar-se o tratamento com fungicidas à base de cobre, cinco a seis semanas antes da vindima, de modo a reduzir o teor de resíduos presentes no mosto, resíduos estes que, contribuem para o aumento da toxicidade do meio e obrigam as leveduras a produzir H_2S para resistir a estas condições (Jackson, 2008).

Durante a fermentação, o mesmo autor defende que, é conveniente numa primeira fase (crescimento exponencial), adicionar fosfato de diamónio (DAP), uma vez que é o momento em que se verifica uma elevada procura de aminoácidos contendo enxofre. A adição de nutrientes tende a combater a acumulação de H_2S nos primeiros estados da fermentação. A segunda fase de produção de H_2S está relacionada com a concentração de azoto assimilável no mosto, apontando a carência de vitaminas (pantetonato B5 e piridoxina B6) e aminoácidos como razão principal para a produção deste tipo de compostos.

A diminuição da produção de H_2S também pode ser obtida utilizando temperaturas de fermentação mais baixas, reduzindo o nível de sólidos em suspensão, fermentando em depósitos de menor volume (evita que o potencial redox desça rapidamente), e evitando excesso de sulfuroso (SO_2) (Jackson, 2008).

A oxidação do H_2S a enxofre elementar, através de arejamento, leva à sua precipitação evitando que num ambiente redutor possa voltar a ácido sulfídrico (H_2S) (Jackson, 2008). Este arejamento ligeiro ocorre durante o processo habitual de trasfega dos vinhos, sendo de evitar a oxidação excessiva pelos efeitos negativos que pode ter no aroma dos vinhos.

De acordo com Ugliano *et al.* (2009), o teor de alguns metais afecta a produção de compostos reduzidos de enxofre. Por sua vez, o teor de metais do vinho depende de vários factores, como o solo, a casta das uvas, as condições ambientais, as práticas vitícolas e enológicas (Catarino *et al.*, 2006), pelo que não é fácil individualizar as relações causa-efeito na produção do aroma a “reduzido”.

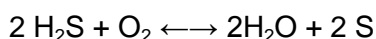
Tabela 3 - Factores que afectam a produção de compostos sulfurados, seu diagnóstico e prevenção (adaptado de Ugliano *et al.*, 2009).

FONTE	MECANISMO	DIAGNÓSTICO	PREVENÇÃO
Agroquímicos Ex.: enxofre elementar	Redução química e bioquímica	<ul style="list-style-type: none"> - Utilização de enxofre - Não cumprimento dos intervalos de segurança - Utilização de certos fungicidas contendo S - Trasega tardia após fim da fermentação. 	<ul style="list-style-type: none"> - Limitar a utilização de enxofre - Respeitar o intervalo de segurança dos produtos - Reduzir o conteúdo de sólidos em suspensão - No final da fermentação fazer de imediato a trasega
Catiões metálicos Ex: cobre, ferro, zinco, magnésio	Redução química, metabolismo das leveduras	<ul style="list-style-type: none"> - Utilização de agroquímicos que contêm catiões metálicos em excesso - Excesso de catiões de cobre no mosto 	<ul style="list-style-type: none"> - Evitar a aplicação tardia de agroquímicos contendo catiões metálicos; - Evitar adição de cobre durante a fermentação
Enxofre inorgânico Ex: sulfato, sulfito	Bioredução – sequência de redução sulfatos induzida pelo <i>stress</i> da falta de nutrientes	<ul style="list-style-type: none"> - Leveduras produtoras de H₂S - Baixo teor de azoto disponível - Baixo teor de vitaminas - Excesso de SO₂ no mosto 	<ul style="list-style-type: none"> - Escolher a levedura que produz menos H₂S - Adicionar de forma adequada nutrientes - Realizar adições regradas de SO₂, durante a colheita e transporte
Enxofre orgânico Ex: cisteína, metionina	Degradação de proteínas e aminoácidos, causa da falta de nutrientes	<ul style="list-style-type: none"> - Permanência em contacto com borras; - Leveduras produtoras de H₂S - Baixo teor de vitaminas - Condições de fermentação muito reductoras 	<ul style="list-style-type: none"> - Trasegar o vinho o mais cedo possível - Escolher a levedura que produz menos H₂S - Adicionar de forma adequada nutrientes - Promover arejamento
Leveduras nativas	Bioredução – provocada pela falta de nutrientes	<ul style="list-style-type: none"> - Elevado número de leveduras nativas no mosto - Baixa taxa de conversão na fermentação - Baixo teor de azoto, vitaminas - Condições de fermentação muito reductoras 	<ul style="list-style-type: none"> - Eliminar a flora nativa, com a adição de SO₂, inocular com leveduras seleccionadas - Inocular novamente com leveduras seleccionadas - Adicionar de forma adequada nutrientes - Promover arejamento

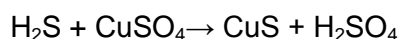
1.5 Tratamento

Todo os compostos em estudo são, em geral, de difícil eliminação, pelo que é sempre preferível agir de forma preventiva, em vez de forma curativa. No entanto, o aparecimento destes compostos é inevitável em determinadas circunstâncias, pelo que é necessário removê-los o mais depressa possível, para que não evoluam como descrito anteriormente.

Sendo a molécula de H₂S aquela que, na maioria dos casos, está presente em maior quantidade e dado a sua alta volatilidade, a eliminação pode ser feita com recurso a arejamento ou oxigenação, como se demonstra na equação seguinte. O enxofre precipita e fica depositado no fundo do depósito, devendo ser removido o mais depressa possível, pois a reacção inversa é possível (Zoecklein, 2007).



Outra possível solução para o tratamento destes compostos é a utilização de cobre, pela aplicação de sulfato de cobre (CuSO₄) após o final da fermentação alcoólica, por se tratar de um composto tóxico para as leveduras.



Cumpra porém salientar que, este produto não tem capacidade de reagir com os dissulfetos nem com os compostos de elevado peso molecular (Kaiser, 2010). Por isso apresenta desvantagens que é preciso ter em consideração, não sendo selectivo com os compostos que reage, combinando-se tanto com os indesejáveis como com os desejáveis (que contribuem para as características aromáticas de certas castas).

O cobre pode, também, ser aplicado recorrendo à aplicação de citrato de cobre como descrito por Kaiser (2010), tendo a vantagem de possuir na sua constituição um teor de cobre mais elevado quando comparado com o CuSO₄ (Tabelas 4 e 5).

Tabela 4 Impacto dos tratamentos à base de cobre no vinho (adaptado de Kaiser, 2010).

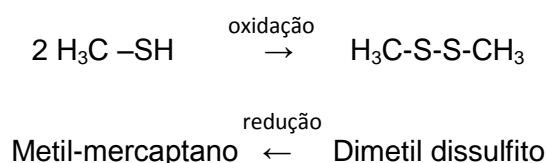
Tratamento	Alterações no vinho
Sulfato de cobre	<ul style="list-style-type: none"> - Aumento do teor de cobre - Aumento na intensidade do amargor - Possibilidade da ocorrência casse cuprosa - Eventual aceleração do envelhecimento
Citrato de cobre (aplicado tendo como suporte a bentonite)	<ul style="list-style-type: none"> - Ligeiro aumento do teor de cobre - Facilmente removível por filtração - Na eventualidade de ficar ácido cítrico residual poderá ser utilizado por bactérias lácticas com produção de aromas indesejáveis.

Outra questão a considerar, é o aumento do teor de cobre e de sulfatos no vinho. Visto serem considerados substâncias tóxicas e estarem sujeitos a limites legais, além desta questão, o excesso de cobre no vinho pode contribuir para a sua instabilidade química podendo causar problemas de casse cuprosa.

Tabela 5 Descrição das substâncias para possíveis tratamentos (adaptado de Kaiser, 2010).

COMPOSTO	FÓRMULA QUÍMICA	TEOR EM COBRE	QUANTIDADE DE COBRE
Sulfato de Cobre	$\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$	25,5 %	1 g = 255 mg
Citrato de Cobre	$\text{Cu}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{O}_7 \times 2.5 \text{ H}_2\text{O}$	35 %	1 g = 350 mg

Na presença de dissulfitos, que por si só não reagem com a molécula de cobre, pode-se utilizar ácido ascórbico como agente redutor para obter moléculas oxidáveis pelo cobre (Jackson, 2008). Um exemplo desta reacção ocorre com o dissulfito de dimetilo-, que não reage com o cobre e, após a aplicação de ácido ascórbico, é convertido em 2 moléculas de metil-mercaptano, que são precipitáveis pelo cobre (Zoecklein, 2007).



A aplicação de ácido ascórbico tem de ser bem monitorizada, dado que é uma molécula que tanto pode ter características antioxidantes (desejável), como actuar como um forte oxidante (indesejável). Esta função depende da presença de SO_2 no vinho, porque o ácido ascórbico ao reagir com o O_2 mais rapidamente que o SO_2 , produz H_2O_2 que tem elevado poder oxidante. Esta molécula, na dose certa, reage apenas com o enxofre, não causando assim o impacto negativo no vinho (Zoecklein, 2007).

Outra possibilidade de tratamento que tem mostrado resultados positivos, é a adição de “borras” finas compostas por leveduras. Estas borras, que são retiradas do vinho que contém defeito, são arejadas durante um dia e os mercaptanos presentes desaparecerem. Quando adicionadas ao vinho as paredes celulares das leveduras combinam-se com os vários aromas a reduzido, removendo-os do meio (Jackson, 2008).

1.6 Enquadramento e objectivos do trabalho

O desenvolvimento do presente trabalho foi suscitado pelo elevado aparecimento de vinhos “reduzidos” numa adega privada da região da Estremadura que recorre, quando necessário, a correcções à base de sulfato de cobre para ultrapassar o problema.

Devido à diversidade de factores que podem afectar o desenvolvimento do defeito em vinhos acabados, numa primeira fase foi feita uma análise retrospectiva do defeito com base nos registos de adega, de forma a obter alguma indicação sobre a sua origem.

Na ausência de tais pistas procurou-se avaliar o efeito dos tratamentos à base de cobre no teor em metais dos vinhos. De facto, como vimos anteriormente, o teor em alguns metais afecta a produção de compostos reduzidos de enxofre (Ugliano *et al.*, 2009) e depende de vários factores, como o solo, a casta, as condições ambientais, as práticas vitícolas e enológicas (Catarino *et al.*, 2006). Ainda sabendo que a localização geográfica dos vinhos parece estar reflectida na composição em metais (Catarino *et al.*, 2010), interessa verificar se a aplicação de tratamentos à base de cobre pode alterar a capacidade discriminativa desta determinação.

Assim, os nossos objectivos foram:

- a) Analisar o problema ao longo dos últimos anos de forma a identificar pistas que expliquem a sua incidência e severidade;
- b) Avaliar se as correcções à base de cobre alteram a composição em metais e, consequentemente, invalidam a possibilidade de localização geográfica dos vinhos com base nesta determinação

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Análise dos dados de adega

Com base nos registos de adega, de 2004 a 2010, foi possível verificar qual o volume de vinho reduzido e a dose de sulfato de cobre utilizada para resolver o problema. Esses dados foram relacionados com as datas de vindima e duração das fermentações. A incidência de vinhos reduzidos na adega em estudo levou-nos à individualização dos diversos tipos de vinho produzidos e a seleccionar quais os vinhos para as determinações subsequentes.

2.1 Tratamento dos vinhos reduzidos

2.1.1 Selecção de amostras

A escolha dos vinhos para a realização deste trabalho teve três critérios de selecção: o primeiro, baseou-se na experiência e dados da empresa, de modo a diminuir o leque de opções disponíveis e sobre as quais iriam incidir os restantes critérios, o segundo, de acordo com a prova organoléptica, realizada por parte dos colaboradores da empresa, foram seleccionados os vinhos que apresentavam maior intensidade de aroma a “reduzido”, o Terceiro, tendo em linha de conta a realização do teste proposto por Zoecklein (2001), abaixo descrito, foram seleccionadas as amostras que apresentavam maior quantidade de H₂S.

Os vinhos usados no trabalho encontram-se descritos na tabela 6. Dos seis vinhos analisados, um pertenceu à colheita de 2009 (amostra 1), porque, apesar de ter algum tempo de estágio, ainda mostrava sinais claros de redução. Os restantes cinco pertenceram à colheita de 2010 e foram seleccionados de acordo com os critérios referidos anteriormente. A amostra 5 e a amostra 6 representam um lote vinho original que foi separado por dois depósitos.

Tabela 6 Descrição dos vinhos analisados.

Amostra	Constituição	Ano	Volume (l)
Amostra 1	Tinta Roriz	2009	26000
Amostra 2	Tinta Barroca	2010	26000
Amostra 3	Castelão, Alicante Bouschet	2010	26000
Amostra 4	Castelão, Tinta Miúda, Alicante Bouschet, outras	2010	50000
Amostra 5	Lote	2010	30000
Amostra 6	Lote	2010	25000

2.1.2 Prova organoléptica

Painel de prova

O painel de prova foi constituído por quatro colaboradores da empresa, onde foi realizado o estudo, que possuem experiência e formação técnica de prova de vinhos. A prova realizou-se no laboratório da empresa, e as amostras analisadas foram numeradas para não existir a possibilidade de identificação da amostra. O objectivo da prova foi detectar a presença ou ausência do defeito nas amostras em estudo. Para registo dos resultados da prova, elaborou-se uma ficha de prova (anexo 1) que contempla os três ensaios para cada vinho, onde os provadores indicaram se detectaram ou não a presença do defeito.

A avaliação da intensidade do defeito foi feita com base num método descrito por Zoecklein (2001). Este autor propôs um teste prático qualitativo que permite determinar qual o tipo de moléculas presentes no vinho que contribuem para o aroma a reduzido e o teor de cobre necessário à remoção do problema. Esta avaliação é feita apenas com base no aroma do vinho.

Os reagentes usados foram:

- Solução de sulfato de cobre (1% p/v): em 90 ml de água destilada, dissolver 1 gr de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, perfazer a 100 ml.
- Solução de sulfato de cádmio (1% p/v): em 90 ml de água destilada, dissolver 1 gr de $\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$, perfazer a 100 ml.
- Solução de ácido ascórbico (10% p/v): em 90 ml de água destilada, dissolver 10 gr de ácido ascórbico, perfazer os 100 ml.

O procedimento foi o seguinte:

1. Colocar em 3 copos, 50 ml de vinho;
2. Marcar um copo com controlo;
3. No segundo copo, marcar com cobre, e aos 50 ml de vinho adicionar 1 ml da solução sulfato de cobre previamente preparada;
4. No terceiro copo, marcar com cádmio e adicionar aos 50 ml de vinho 1 ml da solução sulfato de cádmio;
5. Agitar os três copos;
6. Cheirar o copo “controlo”, e depois os restantes, com o auxílio da tabela 7 interpretar os resultados.

Tabela 7 Interpretação da análise sensorial do defeito, após a adição cobre e cádmio.

Copo 1 (Controlo)	Copo 2 (Cobre)	Copo 3 (Cádmio)	Interpretação
Presença de aroma a reduzido	Ausência do aroma reduzido	Ausência do aroma reduzido	Presença de H ₂ S
	Ausência do aroma reduzido	Sem alteração	Presença de Mercaptanos
	Ausência do aroma reduzido	Aroma a reduzido menos intenso	Presença de H ₂ S e Mercaptanos
	Sem alteração	Sem alteração	a

^a O aroma desagradável não provém de H₂S ou mercaptanos, ou o metil-mercaptano foi oxidado a dissulfureto de dimetilo.

Se a avaliação do aroma a reduzido, indicar que estamos na presença de um composto que nem é H₂S nem é mercaptano (situação a), é necessário proceder a outro teste para verificar se esse é dissulfureto de dimetilo:

1. Colocar noutro copo, 50 ml de vinho que ainda não tenha sido tratado;
2. Adicionar 0,5 ml da solução de ácido ascórbico, agitar e deixar repousar durante alguns minutos;
3. Adicionar 1 ml da solução de sulfato de cobre, agitar, e avaliar se houve alterações do aroma;
4. Se o odor desagradável apresentar menor intensidade que o copo 2 (ao qual se adicionou cobre), pode-se suspeitar da presença de dimetil dissulfureto. Este composto não reage com o cobre, no entanto na presença de ácido ascórbico é convertido em metil-mercaptano, que é oxidado na presença de cobre;

No decorrer deste teste, no copo de controlo o aroma desagradável não se deve alterar muito, no entanto é natural que reduza de intensidade, por processos de oxidação, isto pode sugerir uma eventual forma de corrigir o problema.

Para determinar a quantidade de solução de sulfato de cobre a aplicar em cada garrafa de amostra, procedeu-se a um ensaio de prova, em que foram colocados 50 ml da amostra no copo de prova. Posteriormente foram adicionadas fracções de 0,05 ml (aproximadamente 1 gota numa pipeta graduada de 1 ml), até que o defeito desaparecesse. Foram realizados 4 ensaios independentes, com 4 provadores diferentes. O tratamento feito às amostras de vinho baseou-se na média dos resultados obtidos para os 4 provadores.

No decorrer do tratamento, as garrafas que ficaram como testemunha, sofreram o mesmo processo de tratamento mas sem adição de sulfato de cobre. As amostras que após o primeiro tratamento mantiveram o defeito (avaliado pela segunda vez, 10 dias após o 1º tratamento) foram, novamente, avaliadas sensorialmente. Procedeu-se ao 2º tratamento com base nas médias obtidas na prova, e decorridos 10 dias as amostras foram novamente provadas. O processo repetiu-se até o defeito desaparecer.

2.2 Análise multi-elementar

A técnica utilizada na determinação multi-elementar de metais foi o Inductively Coupled Plasma mass Spectrometry (espectrometria de massa acoplada a plasma indutivo) (ICP-MS), que possui uma elevada sensibilidade e selectividade aliada a limites de detecção baixos (Catarino *et al.*, 2006).

A técnica de ICP-MS permite duas abordagens diferentes ao teor de minerais do vinho, de modo a que se possa fazer uma análise quantitativa ou uma análise semi-quantitativa.

Na primeira análise, apesar do aumento de rigor na determinação, os recursos que são exigidos para que tal aconteça são maiores. Nomeadamente são necessárias calibrações individuais para cada elemento que se pretenda determinar, o que, para além dos custos que acarreta, torna todo o processo mais demorado.

Na análise semi-quantitativa, que é uma das alternativas ao método quantitativo do aparelho utilizado, torna-se possível a determinação de 81 elementos com um erro inferior a 20% para a maioria dos elementos, quando comparado com o método quantitativo (Catarino *et al.*, 2006).

O método semi-quantitativo baseia-se na leitura de apenas alguns isótopos para cada elemento, e depois estabelece uma correlação com o conteúdo desse elemento no vinho, tendo em linha de conta os interferentes que estão no meio. O processo de funcionamento do equipamento, inicia-se com a optimização, tendo como objectivo, certificar que as diferentes partes que compõem o equipamento se encontram a funcionar correctamente. Para o efeito foram utilizadas duas soluções mono-elementares, uma delas contendo Be, Co e In ($10 \mu\text{g l}^{-1}$) e outra contendo Mg, Cu, Rh, Cd, In, Ba, Ce, Pb e U ($10 \mu\text{g l}^{-1}$). As condições escolhidas são um compromisso entre o sinal mais intenso lido para o ião ^{103}Rh , e a menor relação entre $\text{Ba}^{2+}/\text{Ba}^{+}$ e $\text{CeO}^{+}/\text{Ce}^{+}$ (qualquer uma destas relações são sempre inferiores a 3%)

A calibração do aparelho foi feita com recurso a uma solução que contém 30 elementos (Li, Be, Na, Mg, Al, K, Ca, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Ga, As, Se, Rb, Sr, Ag, Cd, In, Cs, Ba, Hg, Tl, Pb, Bi, U) numa concentração conhecida (10 mg l^{-1}), uma vez que é utilizada para ajustar uma recta de calibração predefinida, que permite estabelecer uma correlação entre a intensidade medida dos iões, e a concentração do respectivo elemento na solução.

De forma a adequar a calibração com as amostras a analisar (vinho tinto), foi obtida uma solução padrão a partir da solução referida anteriormente. Esta solução tem na sua composição Ca ($500 \mu\text{g l}^{-1}$), Mg ($500 \mu\text{g l}^{-1}$), Na ($500 \mu\text{g l}^{-1}$), Al ($100 \mu\text{g l}^{-1}$), Fe ($100 \mu\text{g l}^{-1}$), Zn ($90 \mu\text{g l}^{-1}$), os restantes elementos têm a concentração de $40 \mu\text{g l}^{-1}$, As, Ba, Be, Bi, Cd, Co, Cr, Cs, Cu, Ga, In, Li, Mn, Ni, Pb, Rb, Se, Ag, Sr, Tl, V, U.

O branco de calibração foi composto por 1% HNO_3 (v/v), $1 \mu\text{l l}^{-1}$ Rh, $1 \mu\text{l l}^{-1}$ Re, 1% $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (v/v). As amostras a analisar foram diluídas a 1:10, e foi adicionado 1% de HNO_3 , 1% de Rh

e 1% Re. As condições de funcionamento que foram utilizadas r.f 1200 W, ritmo de recolha de amostra 0.85 ml.min^{-1} , o fluxo de nebulização de árgon compreendido entre 0.85 e 0.95 l.min^{-1} . Para haver uma estabilização do sinal de leitura, utilizou-se um período de 75 s em cada leitura. Entre as leituras foi efectuada a lavagem do circuito durante 90 s recorrendo a uma solução de lavagem contendo 2 % HNO_3 . Para padrões internos dos elementos foram utilizados o Rh e Re com leituras para o espectro de massas 6 – 11; 23 – 27; 35 – 35; 42 – 209; 232 – 238.

2.2.1 Equipamento e reagentes

Para a análise multi-elementar recorreu-se a um espectrómetro de massa com plasma acoplado por indução ELAN 9000 ICP-MS (Perkin Elmer Sciex, Concord, Ontario, Canada), equipado com bomba peristáltica com 4 canais Gilson, nebulizador *crossflow*, câmara de nebulização em Ryton e cones em Níquel. Foi também utilizado um auto-amostrador Perkin-Elmer AS-93Plus, protegido por câmara de fluxo laminar classe 100 Reinraumtechnik Max Petek. Para a purificação da água utilizada, recorreu-se a um purificador seralpur Pro 90 CN Reinraumtechnik Max Petek.

Para a realização do processo de optimização foram utilizadas soluções padrão mono-elemento da Merck de Be, Co, In, com uma concentração de 1000 mg/L. Para o mesmo efeito foi também utilizada uma solução multi-elemento contendo Mg, Cu, Rh, Cd, In, Ba, Ce, Pb e U, numa concentração de 10 $\mu\text{g/L}$ proveniente da Perkin-Elmer. No procedimento de lavagem, produção de soluções padrão, e brancos, utilizou-se HNO_3 ultra-puro, 70% conc., (J.T.Baker), HNO_3 p.a., 65% conc., bidestilado (várias marcas), $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (Lichrosolv, Merck). A calibração do equipamento foi levada a cabo utilizando uma solução padrão contendo Li, Be, Na, Mg, Al, K, Ca, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Ga, As, Se, Rb, Sr, Ag, Cd, In, Cs, Ba, Hg, Ti, Pb, Bi, U, (10 mg/mL) da Perkin-Elmer. O estabelecimento de padrões internos do ICP-MS foi feito com recurso a soluções padrão mono-elemento de Rh e Re da Merck (1000 mg l^{-1}). O funcionamento do espectrómetro de massa com plasma acoplado por indução foi assegurado pela utilização de Argon 50 (pureza > 99,996%) proveniente da Praxair.

Todo o material utilizado foi feito a partir de polietileno, de forma a reduzir a possibilidade de contaminação, dada a sensibilidade do equipamento, utilizado para análise. Este material foi lavado passado por água destilada, e foi posteriormente imerso numa solução a 20 % de HNO_3 durante 24 horas. Depois de retirado, todo o equipamento foi novamente passado 3 vezes recorrendo a água ultra-pura.

2.2.2 Tratamento estatístico dos dados

As análises estatísticas utilizadas nos dados da composição em metais foram feitas recorrendo ao programa STATGRAPHICS Centurion XVI (Statpoint Technologies, Inc., Virginia, EUA). Primeiro, utilizou-se uma Análise em Componentes Principais (ACP) para agrupar os vinhos de acordo com as semelhanças na composição em metais. Em seguida, efectuou-se uma análise discriminante (AD) com o fim de perceber quais os metais que afectaram significativamente as diferenças entre as composições dos vários vinhos. Por fim, realizou-se uma análise de variância (ANOVA 2 factores com interacção) aos metais identificados pela AD de forma a avaliar quais os que foram afectados pelos tratamentos à base de cobre.

3. Resultados e discussão

3.1 Incidência do defeito

A avaliação da incidência de vinhos reduzidos na adega em estudo foi feita em separado para vinhos brancos, rosados e tintos. Na tabela 8 são apresentados os dados relativos ao vinho branco.

Numa primeira análise, observa-se que houve um incremento significativo na produção de vinho branco, no período em análise, onde a produção passou de 172.000 L em 2004 para uma produção de 532.000 L em 2010, traduzindo-se num aumento de cerca de 300%. Em relação à aplicação de tratamentos, verificou-se que houve a necessidade de tratar o vinho, pelo menos uma vez na maioria dos anos estudados, e em quase todos os depósitos existentes. Em três colheitas foi necessário aplicar um segundo tratamento para retirar o aroma reduzido. Na campanha de 2010 houve um aumento na aplicação do 2º tratamento. É de salientar que, quando surge a necessidade de aplicar o 2º tratamento, em regra, a quantidade de sulfato de cobre aplicada é superior à quantidade aplicada no primeiro tratamento. Este facto sugere que existem moléculas que se encontravam abaixo do limiar de detecção e que se vão libertando com os sucessivos tratamentos. Desta forma, justifica-se o tratamento precoce do vinho, logo a seguir à vindima, quando surgem os primeiros indícios do defeito.

Tabela 8 Incidência do problema ao longo dos anos de colheita no vinho branco e respectivo tratamento.

Vinho branco	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010
Número de depósitos	8	12	19	17	23	21	39
Depósitos tratados uma vez	8	12	19	17	19	20	39
Depósitos tratados duas vezes	----	1	1	---	---	---	16
Vinho produzido (hl)	1.724	2.350	3.207	3.256	3.925	3.960	5.328
Vinho tratado uma vez	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	95,1%	94,9%	100,0%
Vinho tratado duas vezes	---	12,77%	7,80%	----	---	---	35,14%
MÉDIA DO 1º TRATAMENTO (mg/L)	3	3	3	3	3	3	3
MÉDIA DO 2º TRATAMENTO (mg/L)	---	5	4	---	---	---	3,53

A produção de vinho rosado mostrou, também, um aumento muito significativo, passando de 400 hl em 2004 para 5260 hl em 2010. A par com o aumento de produção nos últimos anos, a necessidade de tratar os vinhos mais do que uma vez também sofreu um incremento, indiciando a presença de maior quantidade de compostos reduzidos, e maior dificuldade em removê-los. Na tabela 9 pode-se verificar que o ano 2009 foi aquele que apresentou mais problemas relacionados com o aroma a reduzido. Foi necessário tratar 69% do vinho pela segunda vez e, ainda, um terceiro e quarto tratamentos a 57% do vinho rosado. Por fim, a 6% da produção foi necessário aplicar o 5º tratamento. É uma situação preocupante, pois mostra a susceptibilidade deste tipo de vinhos ao aparecimento do defeito.

Tabela 9 Incidência do problema ao longo dos anos de colheita no vinho rosado e respectivo tratamento.

Vinho Rosado	2005	2006	2007	2008	2009	2010
Depósitos	2	2	2	3	9	17
TRATADOS 1 VEZ	2	2	2	3	9	17
TRATADOS 2 VEZES	---	---	2	1	6	10
TRATADOS 3 VEZES	---	---	---	---	4	3
TRATADOS 4 VEZES	---	---	---	---	4	1
TRATADOS 5 VEZES	---	---	---	---	1	---

Vinho Rosado	2005	2006	2007	2008	2009	2010
VINHO TOTAL (hl)	400	375	1.000	1.300	3.280	5.260
VINHO TRATADO 1 VEZ	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
VINHO TRATADO 2 VEZES	---	---	100,00%	23,08%	69,51%	69,20%
VINHO TRATADO 3 VEZES	---	---	---	---	57,32%	16,35%
VINHO TRATADO 4 VEZES	---	---	---	---	57,32%	9,51%
VINHO TRATADO 5 VEZES	---	---	---	---	6,10%	---
MÉDIA DO 1º TRATAMENTO (mg/L)	3	3	3	3	3	3,24
MÉDIA DO 2º TRATAMENTO (mg/L)	---	---	5	5	4,67	3,7
MÉDIA DO 3º TRATAMENTO (mg/L)	---	---	---	---	4	3,67
MÉDIA DO 4º TRATAMENTO (mg/L)	---	---	---	---	4	3
MÉDIA DO 5º TRATAMENTO (mg/L)	---	---	---	---	3	---

A par com as produções de vinho branco e rosado, a produção de vinho tinto também sofreu um aumento considerável de 2,4 vezes de 2004 para 2010, ou seja de 1.333.500 L para 3.203.000 L. É possível verificar, pela tabela 10, que estamos na presença da espécie de vinho que constantemente apresentou um maior nível de aparecimento de compostos com aroma reduzido, sendo na maioria dos casos, necessário realizar 4 tratamentos. Este facto demonstra que a produção de compostos sulfurados no vinho tinto acontece de uma forma mais sistemática e intensa, e que as moléculas que estão na origem do defeito são de mais difícil remoção.

É de salientar que se registou um decréscimo na necessidade de tratamento de 2008 até 2010, quer a nível de quantidade de vinho tratada, quer na quantidade de tratamento aplicada, o que pode indicar que melhores práticas enológicas estão a ser aplicadas. No entanto, as quantidades aplicadas nestes últimos anos demonstram que o problema apresenta uma gravidade que justifica o seu estudo sistemático.

Tabela 10 Incidência do problema ao longo dos anos de colheita no vinho tinto e respectivo tratamento.

Vinho tinto	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010
Depósitos	55	49	60	57	77	71	88
TRATADOS 1 VEZ	55	48	60	51	70	71	82
TRATADOS 2 VEZES	14	28	27	33	29	32	36

Vinho tinto	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010
TRATADOS 3 VEZES	7	13	13	20	7	9	6
TRATADOS 4 VEZES	1	4	5	5	---	1	---
TRATADOS 5 VEZES	---	1	1	1	---	---	---
VINHO TOTAL (hl)	13.335	14.659	18.066	15.893	21.533	25.665	32.030
VINHO TRATADO 1 VEZ	100,00%	98,64%	100,00%	91,73%	95,01%	100,00%	92,77%
VINHO TRATADO 2 VEZES	47,24%	76,78%	67,09%	78,18%	53,36%	34,85%	42,99%
VINHO TRATADO 3 VEZES	32,62%	42,98%	48,41%	65,12%	32,32%	11,69%	12,43%
VINHO TRATADO 4 VEZES	3,75%	12,28%	22,97%	8,18%	---	0,39%	---
VINHO TRATADO 5 VEZES	---	3,41%	0,83%	1,57%	---	---	---
MÉDIA DO 1º TRATAMENTO (mg/L)	4,93	4,8	4,9	4,63	4,99	4,94	4,35
MÉDIA DO 2º TRATAMENTO (mg/L)	3,57	3,54	3,37	4,58	3,07	3,62	3,69
MÉDIA DO 3º TRATAMENTO (mg/L)	4,29	2,92	3,54	4,2	3	3,5	3,67
MÉDIA DO 4º TRATAMENTO (mg/L)	2	3	4,2	3,4	---	3	---
MÉDIA DO 5º TRATAMENTO (mg/L)	---	3	5	3	---	---	---

3.2 Observações empíricas

Com a finalidade de tentar relacionar o problema com práticas culturais e eventuais dificuldades de maturação das uvas ou no desenrolar da fermentação, avalíamos os dados respectivos das últimas vindimas.

Em relação aos tratamentos fitossanitários, foram uniformes para toda a vinha existente na empresa. Salvo em anos muito específicos ou intempéries pontuais, os produtos aplicados tiveram as mesmas substâncias activas, pelo que não foi possível estabelecer relação entre os tratamentos e o aparecimento do defeito.

Tendo em linha de conta a data de início de vindima e tempo médio de fermentação para cada tipo de vinho (tabela 11), não se observou nenhuma relação clara com a produção de compostos com aroma a reduzido para todos os vinhos. No caso do vinho branco, os anos com maior incidência do defeito (2010, 2005 e 2006, ordenados de forma decrescente), parecem estar relacionados com um início mais precoce das vindimas (26, 29 e 30 de Agosto, respectivamente) e um maior tempo médio de fermentação (15, 14 e 11 dias). Estes

resultados justificam que na próxima vindima se façam ensaios industriais comparativos entre o mesmo mosto vinificado a diferentes temperaturas, e com maturações distintas.

Se analisarmos os dados para o vinho rosado, concluímos que não parece haver qualquer contributo do início de vindima, ou do tempo médio de fermentação. Nos anos de 2009 e 2010, de maior incidência do problema, o tempo médio de fermentação foi praticamente idêntico, e o início de vindima ficou muito próximo um do outro.

Em relação ao vinho tinto, os anos mais graves foram os de 2005, 2007 e, em particular, 2006. Curiosamente, 2006 foi o ano em que as fermentações mais demoraram a completar-se.

Tabela 11 Data de início de cada vindima e média de dias de fermentação para cada tipo de vinho.

Ano	DATA DE INICIO DE VINDIMA	Dias de fermentação		
		Branco	Rosé	Tinto
2004	2 de Setembro	18	--	9
2005	29 de Agosto	14	8	11
2006	30 de Agosto	11	7	17
2007	5 de Setembro	16	13	13
2008	28 de Agosto	13	8	13
2009	20 de Agosto	13	8	11
2010	26 de Agosto	15	9	13

A levedura utilizada na grande maioria dos vinhos foi a QA23. No entanto, nos últimos 3 anos têm vindo a fazer-se ensaios com outras leveduras, para obter outros tipos de vinho. Os dados existentes não permitem comparar a utilização de diferentes tipos de leveduras com o aparecimento do defeito.

As correcções de azoto no mosto também podem ter influência no aparecimento do defeito. As correcções são feitas no pressuposto que o mosto praticamente não tem azoto disponível, e como tal adiciona-se a quantidade que se considera necessária para as leveduras levarem a fermentação até ao fim. Desta forma, a produção de compostos reduzidos deverá estar dependente de outros factores.

As remontagens têm sido sempre feitas sem arejamento. Em 2010 foi feito um esforço para remontar os vinhos sempre com arejamento, e numa primeira abordagem parece que o problema foi mitigado, mas os resultados não foram conclusivos.

Em conclusão, com base nestes resultados empíricos, é possível apontar que as condições de fermentação são a principal pista para a resolução do problema. Em nossa opinião, deviam ser testadas novas formas de remontagem e arejamento dos vinhos, recorrendo às denominadas cubas argelinas e a realização de micro-oxigenação. De facto, nas condições actuais, a dimensão e conformação dos depósitos poderá dificultar a saída de gás carbónico.

3.3 Determinação do defeito

Após a selecção dos vinhos que apresentaram o defeito de forma mais evidenciada (Anexo I), procedeu-se ao teste proposto por Zoecklein (2001) para se seleccionar as amostras que possuíam na sua constituição maior presença de H₂S e de mercaptanos. Depois de realizado o ensaio (tabela 12), concluiu-se que as amostras 1 a 6, seriam as mais indicadas para o estudo. As amostras 7 e 8 mostraram aromas diferentes do pretendido, do tipo dissulfureto de dimetilo, que é um composto que advém da evolução de compostos, sendo difícil de remover com sulfato de cobre, fazendo com que estas amostras não fossem indicadas para o estudo em questão.

Tabela 12 Resultados obtidos na prova olfactiva, através da execução do teste de Zoecklein (2001), que permite determinar que tipo de compostos estão presente na amostra.

Amostras	Prorador	Copo 1	Copo 2	Copo 3	Interpretação
1	1	Sim	Não	Sim	H ₂ S + mercaptanos
	2	Não	Não	Não	Ausência defeito
	3	Sim	Não	Sim	H ₂ S + Mercaptanos
	4	Sim	Sim	Sim	Dimetil dissulfureto
2	1	Sim	Não	Sim	H ₂ S + Mercaptanos
	2	Sim	Não	Sim	H ₂ S + Mercaptanos
	3	Sim	Não	Sim	H ₂ S + Mercaptanos
	4	Sim	Não	Sim	H ₂ S + Mercaptanos
3	1	Sim	Não	Sim	H ₂ S + Mercaptanos
	2	Não	Não	Não	Ausência defeito
	3	Sim	Não	Sim	H ₂ S + Mercaptanos
	4	Sim	Não	Sim	H ₂ S + Mercaptanos
4	1	Sim	Não	Sim	H ₂ S + Mercaptanos
	2	Sim	Não	Sim	H ₂ S + Mercaptanos
	3	Sim	Não	Sim	H ₂ S + Mercaptanos
	4	Sim	Não	Sim	H ₂ S + Mercaptanos
5	1	Sim	Não	Sim	H ₂ S + Mercaptanos
	2	Sim	Não	Sim	H ₂ S + Mercaptanos
	3	Sim	Sim	Sim	Dimetil dissulfureto
	4	Sim	Não	Sim	H ₂ S + Mercaptanos
6	1	Sim	Não	Sim	H ₂ S + Mercaptanos
	2	Sim	Não	Sim	H ₂ S + Mercaptanos
	3	Sim	Sim	Sim	Dimetil dissulfureto
	4	Sim	Não	Sim	H ₂ S + Mercaptanos
7	1	Sim	Sim	Sim	Dissulfureto de dimetilo
	2	Sim	Sim	Sim	Dimetil dissulfureto
	3	Sim	Sim	Sim	Dimetil dissulfureto
	4	Sim	Sim	Sim	Dimetil dissulfureto
8	1	Sim	Sim	Sim	Dimetil dissulfureto
	2	Sim	Sim	Sim	Dimetil dissulfureto
	3	Sim	Sim	Sim	Dimetil dissulfureto
	4	Sim	Sim	Sim	Dimetil dissulfureto

3.4 Correção do defeito

No decorrer do trabalho experimental foi necessário tratar as amostras com sulfato de cobre, até que o defeito a reduzido desaparecesse. Para tal, os vinhos escolhidos na fase anterior, foram novamente submetidos a prova (Anexo I). Nesta fase, com o objectivo de eliminar o defeito, pediu-se a cada provador que, comparando com o copo testemunha, verificasse se a cada porção de 0,05 ml de solução CuSO_4 aplicada, o defeito permanecia ou não. Assim se obteve a quantidade de produto que eliminou o defeito a aplicar por garrafa de amostra (tabela 13). Comparando o desempenho dos provadores ao longo de cada amostra podemos concluir que a sensibilidade ao defeito difere de provador para provador. Após 8 dias, foi realizada uma 3ª prova para verificar se o 2º tratamento foi suficiente para retirar o defeito. Nessa prova constatou-se não ser necessário proceder a mais nenhum tratamento, uma vez que os vinhos já não apresentavam defeito.

Tabela 13 Volume (ml) de solução de sulfato de cobre (concentração 1 g/l) necessários para fazer desaparecer o defeito nos copos de prova (50 ml).

Amostra	Provador 1		Provador 2		Provador 3		Provador 4		Média	
	1ª	2ª	1ª	2ª	1ª	2ª	1ª	2ª	1ª	2ª
	Prova	Prova	Prova	Prova	Prova	Prova	Prova	Prova	Prova	Prova
1	0,15	S/D	0,30	S/D	0,10	S/D	0,35	S/D	0,23	-
2	0,10	0,20	0,10	0,15	0,15	0,20	0,20	0,20	0,14	0,19
3	0,15	S/D	0,15	S/D	0,15	S/D	0,15	S/D	0,15	-
4	0,15	0,25	0,30	0,15	0,10	0,20	0,25	0,20	0,20	0,20
5	0,15	0,25	0,15	0,20	0,20	0,10	0,20	0,20	0,18	0,19
6	0,10	0,25	0,10	0,25	0,10	0,15	0,15	0,25	0,11	0,23

S/D – Amostra não apresentou defeito.

Na tabela 14 está contabilizada a quantidade de CuSO_4 que foi necessário adicionar às amostras que retirar o defeito. Analisando a quantidade adicionada às amostras constatamos que estão dentro dos valores habitualmente usados na empresa em estudo.

Tabela 14. Quantidade de sulfato de cobre adicionado a cada amostra (mg/L) para retirar o defeito.

<i>Amostra</i>	<i>1º Tratamento</i>	<i>2º Tratamento</i>	<i>Total</i>
1	4,5	S/D	4,5
2	2,8	3,8	6,6
3	3,0	S/D	3,0
4	4,0	4,0	8,0
5	3,5	3,8	7,3
6	2,3	4,5	6,8

3.5 Composição em metais dos vinhos

Na tabela 15 estão indicados os teores dos diferentes metais presentes nos vinhos, antes e após o tratamento total para remover o defeito. A análise estatística dos resultados foi feita recorrendo a uma Análise de Componentes Principais (ACP) (Anexo II) cuja representação espacial se encontra na figura 2. Esta análise permitiu concluir que o factor amostra foi preponderante na separação dos vinhos analisados. Ou seja, as modalidades analisadas (tratado e não tratado) tiveram uma contribuição mais fraca, não contribuindo, numa primeira análise, para uma distinção entre os vinhos (figura 3).

Em relação aos vinhos, a amostra 2 foi a que mais se separou das restantes. Tal poderá dever-se ao facto de ser um vinho exclusivamente de Tinta Barroca, casta que não integra nenhuma das restantes amostras.

Em relação às amostras 3 e 4, localizadas no canto inferior esquerdo da figura, têm na sua constituição castas idênticas, como seja o Castelão e o Alicante Bouschet.

Na mesma linha de raciocínio, as amostras 5 e 6 têm a mesma origem, ainda que tenham sido recolhidas em depósitos e momentos diferentes, pelo que a sua semelhança era de esperar.

A amostra 1, uma Tinta Roriz de 2009, apesar de se encontrar separada e numa zona bem delimitada das amostras 5 e 6, a sua constituição é mais semelhante a estas do que aos restantes vinhos. A composição em metais depende, não só dos solos onde as vinhas estão instaladas mas também das práticas vitícolas (Trujillo et al., 2010). Como as vinhas se encontram na mesma propriedade com solos semelhantes e foram tratadas da mesma forma, pensamos que as diferenças registadas se devam principalmente às castas de origem.

Em suma, os resultados obtidos sugerem que a distinção entre os diferentes vinhos resulta das diferentes castas utilizadas, não havendo diferenças significativas induzidas pela aplicação de sulfato de cobre.

Tabela 15 Composição em metais dos vinhos analisados (média de 2 determinações, CV – coeficiente de variação).

Metais	Unidades	Amostra 1						Amostra 2					
		Após tratamento				Após tratamento				Após tratamento			
		Controlo	CV	Sem Adição de CuSO ₄	CV	Com Adição de CuSO ₄	CV	Controlo	CV	Sem Adição de CuSO ₄	CV	Com Adição de CuSO ₄	CV
Li	µg/L	9,5	3,7	9,4	0,4	9,1	4,7	8,7	0,2	7,9	1,8	8,0	0,3
Be	µg/L	0,1	6,9	0,1	11,8	0,1	1,5	0,1	6,6	0,1	17,2	0,2	8,7
B	mg/L	2,1	5,3	2,2	0,3	2,1	3,1	2,0	2,5	1,9	1,0	1,9	0,2
Na	mg/L	16,9	2,9	13,8	0,6	13,8	1,1	23,2	1,9	1,8	2,6	18,7	0,5
Mg	mg/L	81	3,4	75,8	0,4	74,3	1,6	79,3	1,7	71,3	1,6	73,7	0,0
Al	mg/L	0,3	2,2	0,2	0,1	0,2	3,5	0,1	1,9	0,1	1,1	0,1	0,9
Ca	mg/L	40,7	1,8	35,5	0,5	34,6	2,0	52,7	2,0	44,9	0,5	45,0	6,2
Ti	µg/L	20,7	0,0	15,1	0,4	15,6	6,6	23,1	9,1	17,9	2,3	17,2	4,1
V	µg/L	0,4	6,7	0,3	9,8	0,3	7,0	0,2	22,5	0,1	14,5	0,1	10,6
Mn	mg/L	0,6	0,9	0,6	1,2	0,6	2,4	0,5	0,5	0,4	1,8	0,5	0,1
Fe	mg/L	1,9	1,7	1,8	0,6	1,7	1,7	1,4	2,1	1,3	2,4	1,3	0,6
Co	µg/L	1,8	1,6	1,9	0,7	1,8	4,2	1,6	0,2	1,5	4,1	1,6	4,0
Ni	µg/L	15,8	2,3	15,1	6,6	15,3	0,9	10,1	6,9	7,6	4,8	8,2	4,8
Cu	µg/L	91,7	11,0	110,9	13,2	864,2	7,3	496,7	1,5	447,1	0,9	1702,1	0,1
Zn	mg/L	0,8	3,7	0,7	6,3	0,6	4,6	0,5	0,8	0,4	6,8	0,4	6,7
Ga	µg/L	2,5	2,9	3,0	2	3,0	5,1	4,4	3,4	4,1	1,9	4,2	1,8
As	µg/L	0,6	13,7	0,8	8,8	1,0	1,0	1,3	1,3	1,1	3,2	1,1	1,1
Se	µg/L	1,4	2,7	1,3	25	1,1	15,3	1,5	13,2	1,3	2,7	1,2	9,0
Rb	mg/L	2,1	0,4	2,0	0	2,0	1,5	2,0	1,9	1,4	45,7	1,9	0,7
Sr	mg/L	0,2	0,8	0,2	1,2	0,2	2,2	0,3	0,9	0,3	0,8	0,3	0,5
Y	ng/L	55,6	6,0	57,1	15,8	53,0	9,6	33,8	1,9	29,8	2,8	27,5	15,0
Zr	µg/L	0,2	4,9	0,2	11,7	0,2	31,1	0,1	16,8	0,1	19,7	0,1	46,8
Mo	µg/L	0,9	0,8	1,0	26,2	0,8	3,4	1,2	0,6	1,1	1,1	1,1	0,8
Cd	µg/L	0,2	1,0	0,4	74,3	0,2	16,4	0,2	27,0	0,1	20,7	0,2	30,0
Sb	µg/L	0,3	1,0	0,3	1,8	0,3	0,5	0,1	28,9	0,1	5,9	0,1	8,8
Cs	µg/L	10,2	0,0	10,3	0,8	10,1	1,3	9,4	1,1	9,2	1,1	9,4	0,3
Ba	µg/L	97,3	1,6	96,2	0,2	94,4	0,9	133,3	0,1	131,2	1,7	133,5	0,6
W	ng/L	44,5	1,5	53,6	6,2	44,4	4,5	40,5	0,8	24,4	1,8	32,8	7,6
Tl	µg/L	0,4	5,2	0,4	7	0,4	13,6	0,8	0,3	0,8	1,6	0,8	1,5
Pb	µg/L	6,8	1,3	8,0	21,3	6,7	1,1	4,6	5,3	4,8	0,9	4,9	2,1

Metais	Unidades	Amostra 3						Amostra 4					
		Após tratamento								Após tratamento			
		Controlo	CV	S\ Adição de CuSO4	CV	C\ Adição de CuSO4	CV	Controlo	CV	S\ Adição de CuSO4	CV	C\ Adição de CuSO4	CV
Li	µg/L	14,0	1,5	12,8	1,5	12,9	0,1	11,9	2,3	12,2	1,6	12,1	0,1
Be	µg/L	0,2	14,2	0,1	1,5	0,1	25,6	0,2	27,0	0,2	3,2	0,2	21,1
B	mg/L	1,7	1,9	1,6	1,1	1,6	1,6	1,6	3,7	1,6	2,4	1,6	0,7
Na	mg/L	20,9	0,8	14,4	2,7	15,4	1,7	18,9	1,3	16,4	2,3	16,9	1,3
Mg	mg/L	66,6	1,8	59,0	1,7	59,6	0,9	70,5	0,2	74,1	2,2	74,5	0,9
Al	mg/L	0,3	0,1	0,3	2,5	0,3	2,1	0,3	6,9	0,3	1,1	0,3	4,6
Ca	mg/L	65,0	1,2	53,5	1,5	53,2	2,5	54,4	0,8	47,3	45,0	61,2	0,3
Ti	µg/L	31,3	12,9	29,8	0,6	27,0	5,6	32,3	16,5	29,8	0,6	25,4	4,2
V	µg/L	0,8	0,6	0,7	0,7	0,8	4,1	0,7	0,2	0,7	4,5	0,7	0,9
Mn	mg/L	0,5	0,7	0,5	1,5	0,5	0,6	0,6	1,9	0,6	2,3	0,6	0,7
Fe	mg/L	2,2	0,5	2,1	0,9	2,1	0,8	2,2	1,9	2,2	0,8	2,1	0,9
Co	µg/L	0,2	3,5	1,6	5,4	1,6	4,9	2,1	6,1	1,9	0,4	1,9	2,4
Ni	µg/L	11,1	3,4	8,9	2,5	9,2	4,0	10,2	7,9	10,4	6,0	9,8	2,8
Cu	µg/L	307,0	0,9	231,6	0,0	746,3	0,5	138,1	1,3	136,4	0,2	1570,4	2,0
Zn	mg/L	0,4	0,5	0,3	8,4	0,3	4,1	0,6	5,3	0,6	2,9	0,5	0,6
Ga	µg/L	2,4	5,2	2,2	6,1	2,2	4,5	2,9	7,3	2,9	3,3	2,8	1,4
As	µg/L	1,0	3,6	0,9	2,0	0,9	1,8	1,0	1,6	0,9	0,2	0,9	1,1
Se	µg/L	0,9	6,7	0,7	3,3	0,8	23,4	1,3	36,9	0,9	32,5	0,9	14,7
Rb	mg/L	2,0	1,4	1,9	0,8	1,9	0,5	1,9	2,2	1,9	3,0	1,9	0,1
Sr	mg/L	0,3	1,5	0,3	0,1	0,3	0,9	0,4	0,8	0,4	2,7	0,4	0,1
Y	ng/L	41,5	4,6	33,4	0,1	33,3	15,6	43,0	14,3	34,1	15,6	38,3	2,8
Zr	µg/L	0,1	10,8	0,1	3,8	0,2	74,3	0,2	1,1	0,1	26,9	0,1	4,8
Mo	µg/L	0,8	1,6	0,6	0,2	0,6	0,1	0,7	7,6	0,8	6,4	0,7	1,7
Cd	µg/L	0,1	39,0	0,1	22,9	0,1	7,2	0,2	6,8	0,1	6,8	0,1	16,0
Sb	µg/L	0,2	7,2	0,2	0,0	0,2	2,0	0,2	17,1	0,2	0,7	0,2	3,0
Cs	µg/L	10,7	0,8	10,4	2,3	10,4	1,7	10,0	3,4	10,2	1,5	10,2	0,6
Ba	µg/L	73,9	0,8	70,8	1,3	70,9	1,7	100,0	3,0	99,2	1,7	99,2	0,7
W	ng/L	45,1	24,0	37,3	34,3	39,3	1,3	47,9	19,9	40,9	13,0	43,6	1,8
Tl	µg/L	0,4	3,2	0,4	10,2	0,4	1,6	0,4	6,0	0,4	2,2	0,4	7,4
Pb	µg/L	6,5	0,2	6,3	3,0	6,4	2,3	6,2	2,7	6,6	0,3	6,7	1,1

Metais	Unidades	Amostra 5								Amostra 6							
		Após tratamento				Após tratamento				Após tratamento				Após tratamento			
		Controlo	CV	S\ Adição de CuSO4	CV	C\ Adição de CuSO4	CV	Controlo	CV	S\ Adição de CuSO4	CV	C\ Adição de CuSO4	CV	Controlo	CV	S\ Adição de CuSO4	CV
Li	µg/L	10,4	1,4	10,9	3,0	10,8	0,1	10,5	4,7	11,3	1,4	11,2	2,9				
Be	µg/L	0,2	2,1	0,2	5,5	0,2	2,6	0,3	6,4	0,2	31,3	0,2	7,4				
B	mg/L	1,9	1,8	1,8	17,1	2,0	1,3	1,8	4,6	2,0	2,2	2,0	1,7				
Na	mg/L	18,5	2,0	17,1	2,4	17,0	0,1	19,0	4,1	17,5	1,5	18,6	2,4				
Mg	mg/L	76,0	0,8	80,9	2,1	82,1	1,2	76,4	4,6	84,2	1,6	86,3	3,5				
Al	mg/L	0,3	5,8	0,3	1,8	0,3	1,7	0,3	1,0	0,3	1,8	0,3	1,5				
Ca	mg/L	48,2	0,2	49,4	4,7	49,1	3,0	37,2	4,1	36,5	3,3	36,5	0,5				
Ti	µg/L	16,9	1,4	12,7	50,0	3,9	141,4	n.d	-	14,0	6,0	9,9	51,3				
V	µg/L	0,4	1,7	0,5	0,7	0,5	2,9	0,4	1,5	0,5	0,3	0,5	2,8				
Mn	mg/L	0,8	1,7	0,8	1,8	0,8	2,0	0,8	4,0	0,8	0,6	0,8	1,8				
Fe	mg/L	1,4	0,5	1,5	1,7	1,4	4,0	1,5	3,5	1,5	2,0	1,5	2,1				
Co	µg/L	1,9	2,5	1,9	0,3	1,9	0,6	1,9	5,2	1,9	5,0	1,9	5,4				
Ni	µg/L	19,6	1,1	20,9	5,7	19,0	0,4	18,7	2,5	19,2	1,5	20,0	2,4				
Cu	µg/L	776,7	1,3	724,3	0,8	2049,2	2,1	655,8	4,4	659,6	6,1	1897,7	4,1				
Zn	mg/L	0,5	0,1	0,4	1,6	0,4	1,6	0,5	3,2	0,4	9,2	0,4	2,8				
Ga	µg/L	2,8	5,8	2,6	5,7	2,8	2,3	2,8	5,4	2,5	3,3	2,7	4,3				
As	µg/L	1,7	1,7	1,7	3,0	1,7	2,2	1,7	1,0	1,9	0,2	1,9	2,5				
Se	µg/L	1,2	4,8	0,9	2,5	1,0	2,3	1,2	24,7	0,8	7,9	0,9	7,3				
Rb	mg/L	2,0	1,8	1,9	1,0	1,8	1,5	1,9	4,1	1,9	0,2	1,9	1,8				
Sr	mg/L	0,3	0,1	0,3	1,3	0,3	1,8	0,3	4,6	0,3	0,3	0,3	1,8				
Y	ng/L	46,0	14,4	39,2	14,6	33,4	9,6	35,4	23,8	31,7	6,3	42,0	13,1				
Zr	µg/L	0,1	29,4	0,1	16,6	0,1	4,6	0,1	3,1	0,1	2,9	0,1	8,8				
Mo	µg/L	0,9	5,0	0,8	3,1	0,8	3,4	0,8	14,7	0,8	5,3	0,8	6,7				
Cd	µg/L	0,2	6,5	0,1	0,9	0,1	7,9	0,2	10,0	0,1	29,2	0,1	5,3				
Sb	µg/L	0,3	5,2	0,3	4,0	0,3	3,9	0,3	6,9	0,3	11,2	0,3	2,3				
Cs	µg/L	10,6	1,6	10,8	2,4	10,6	1,3	10,6	3,4	8,0	45,7	10,6	2,2				
Ba	µg/L	92,3	2,6	91,2	1,0	90,4	0,9	91,6	3,5	90,9	0,6	90,8	1,5				
W	ng/L	46,2	2,8	39,1	11,3	38,4	7,3	36,2	16,8	42,9	5,6	45,9	2,2				
Tl	µg/L	0,3	3,8	0,3	8,7	0,3	3,1	0,3	1,5	0,3	0,6	0,3	4,1				
Pb	µg/L	6,3	3,7	6,2	3,6	6,3	0,6	5,7	4,5	6,2	0,1	6,2	0,1				

Na figura 2 estão representadas as leituras das modalidades tratado e não tratado para as 6 amostras, os “clusters” delimitados pelo programa agrupam os pontos pelo número de amostra. Com excepção das amostras 5 e 6 que se encontram dentro do mesmo cluster (visto terem a mesma origem), todas as restantes amostras mostram sinais claros de individualização. Os centroids representam o centro geométrico dos pontos contidos dentro do cluster, obtidos através da média de todos eles.

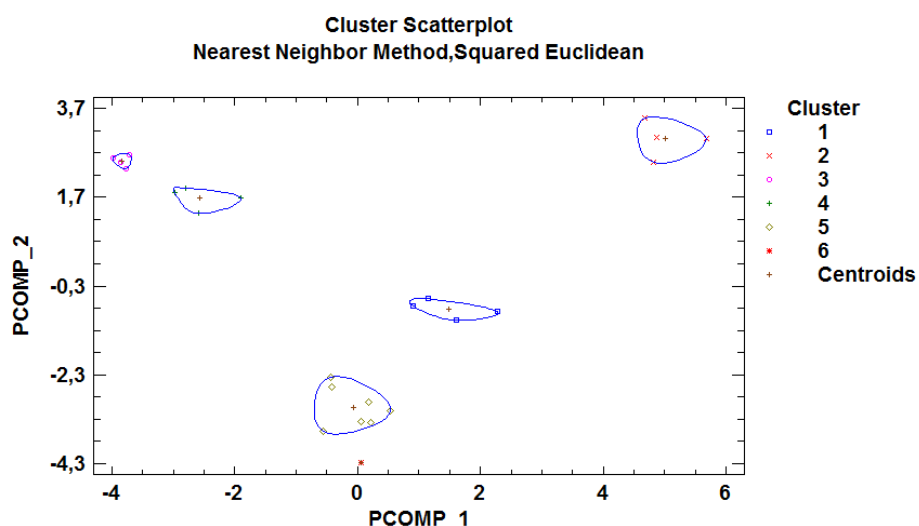


Figura 2 - Representação gráfica das duas primeiras componentes principais resultantes da Análise de Componentes Principais utilizando os 30 elementos da composição em metais das amostras analisadas.

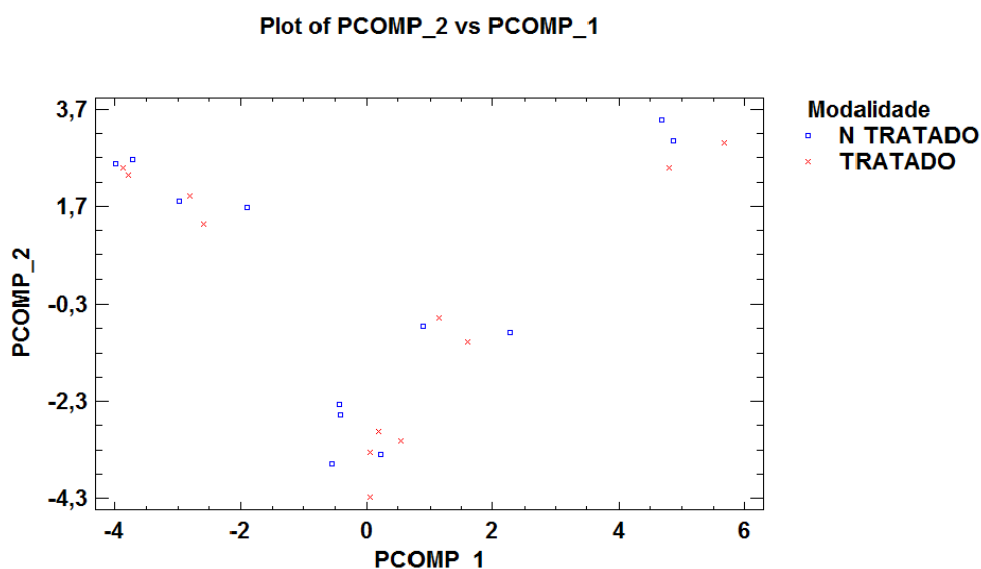


Figura 3 - Representação gráfica das duas primeiras componentes principais resultantes da Análise de Componentes Principais utilizando os 30 elementos da composição em metais das amostras analisadas, tendo como objectivo de diferenciar as modalidades tratado e não tratado.

3.6 Determinação dos elementos com maior peso na discriminação

Os resultados anteriores demonstraram que existiu uma grande semelhança entre os vinhos tratados e não tratados. Com o objectivo de perceber se existiram diferenças significativas entre as modalidades do ensaio em alguns metais que, quando se utilizam os 30 elementos na ACP, podem não ter sido estatisticamente detectadas, procedeu-se a uma análise discriminante (AD) (Anexo III). Na AD o método utilizado foi o “forward selection” e os metais que apresentaram diferenças significativas, em função da modalidade de tratamento, foram o berílio (Be), sódio (Na), titânio (Ti), cobre (Cu), estrôncio (Rb), zircónio (Zr) e o Césio (Cs).

Pela AD foi possível obter os coeficientes de classificação que estabelecem as funções que permitem prever com base na análise dos metais em causa, em que modalidade se encontra a amostra. Na tabela 16 podemos observar esses dados.

Tabela 16 - Coeficientes da função de classificação para a modalidade.

Metal	Vinho não tratado	Vinho tratado
Be	1,06372	0,71812
Na	3,03281E-05	2,23587E-05
Ti	-0,00268003	-0,00146967
Cu	-0,000193909	-0,000117103
Rb	9,21361E-06	6,24413E-06
Zr	-0,0836934	0,016393
Cs	0,0272946	0,0217833
Constante	-409,167	-266,5

Por exemplo, a função utilizada para o primeiro nível da modalidade foi dada por:

$$-409,167 + 1,06372 \cdot \text{Be} + 3,03281\text{E-}05 \cdot \text{Na} - 0,00268003 \cdot \text{Ti} - 0,000193909 \cdot \text{Cu} + 9,21361\text{E-}06 \cdot \text{Rb} \\ - 0,0836934 \cdot \text{Zr} + 0,0272946 \cdot \text{Cs}$$

3.7 Efeito do tratamento nos metais mais relevantes

Tendo como objectivo determinar quais os elementos que sofreram alterações significativas após a realização do tratamento, foi realizado um teste ANOVA com dois factores (amostra e modalidade de tratamento) com interacção para cada elemento referenciado na análise discriminante (Anexo IV). Foi possível concluir que todas as amostras estudadas mostraram diferenças significativas entre si (anexo 3). Tal resultado seria de esperar em função dos resultados da ACP, excepto no caso dos vinhos 5 e 6. No entanto, através da ANOVA foi possível obter diferenças entre os valores de metais para estes dois vinhos que têm a mesma origem (5 e 6).

Em relação à modalidade de tratamento, entre os trinta elementos analisados apenas 6 (As, V, Zn, Cu, Na, Ti) apresentaram diferenças significativas. A conjugação destes resultados com a AD, permitiu observar que, destes 6 elementos, apenas 3 (Cu, Na, Ti) foram considerados como estatisticamente significativos pela AD. Assim, foram realizadas análises ANOVA para estes metais.

A tabela 17 corresponde à ANOVA realizada para o cobre. Neste elemento tanto o factor amostra como o factor modalidade influenciaram significativamente o comportamento do metal para um nível de confiança de 95%, verificando-se efeito de interacção entre os dois factores. Pela tabela 18 podemos verificar que existem diferenças significativas entre as duas modalidades.

Tabela 17 - Resultados da ANOVA (2 factores com interacção) para o Cobre.

Analysis of Variance for Cu - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:Amostra	2,98864E12	5	5,97728E11	489,83	0,0000
B:Modalidade	7,08507E12	1	7,08507E12	5806,17	0,0000
INTERACTIONS					
AB	6,669E11	5	1,3338E11	109,30	0,0000
RESIDUAL	1,46432E10	12	1,22027E9		
TOTAL (CORRECTED)	1,07553E13	23			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

Tabela 18 - Comparação das médias obtidas pela ANOVA recorrendo ao teste de *Tukey* para o Cobre.

Multiple Range Tests for Cu by Modalidade

Method: 95,0 percent Tukey HSD

Modalidade	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
N TRATADO	12	384972,	10084,1	X
TRATADO	12	1,47164E6	10084,1	X

Contrast	Sig.	Difference	+/- Limits
N TRATADO - TRATADO	*	-1,08667E6	31072,2

* denotes a statistically significant difference.

A tabela 19 corresponde à ANOVA realizada para o sódio. Neste elemento tanto o factor amostra como o factor modalidade também influenciaram significativamente o comportamento do metal para um nível de confiança de 95%, no entanto não se verifica efeito de interacção entre os dois factores, significando que um factor não varia com o nível do outro factor. Pela tabela 20 podemos verificar que existem diferenças significativas entre as duas modalidades, e que as duas modalidades provaram ser diferentes entre si.

Tabela 19 - Quadro resumo da ANOVA 2 factores com interacção, ao Sódio

Analysis of Variance for Na - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:Amostra	6,04068E13	5	1,20814E13	125,72	0,0000
B:Modalidade	6,0227E11	1	6,0227E11	6,27	0,0277
INTERACTIONS					
AB	1,08517E12	5	2,17034E11	2,26	0,1149
RESIDUAL	1,15314E12	12	9,60947E10		
TOTAL (CORRECTED)	6,32474E13	23			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

Tabela 20 – comparação das médias obtidas na Anova, representadas no quadro anterior recorrendo ao teste de *Tukey*, para o elemento Sódio

Multiple Range Tests for Na by Modalidade

Method: 95,0 percent Tukey HSD

Modalidade	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
N TRATADO	12	1,64069E7	89486,8	X
TRATADO	12	1,67237E7	89486,8	X

Contrast	Sig.	Difference	+/- Limits
N TRATADO - TRATADO	*	-316825,	275737,

* denotes a statistically significant difference.

A tabela 21 corresponde à ANOVA realizada para o Titânio. Neste elemento tanto o factor amostra como o factor modalidade influenciaram significativamente o comportamento do metal para um nível de confiança de 95%, no entanto tal como o elemento anterior não se verifica efeito de interacção entre os dois factores. Pela tabela 22 podemos verificar que existem diferenças significativas entre si.

Tabela 21 - Quadro resumo da ANOVA 2 factores com interacção, ao Titânio

Analysis of Variance for Ti - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:Amostra	1,35503E9	5	2,71005E8	31,76	0,0000
B:Modalidade	6,84967E7	1	6,84967E7	8,03	0,0151
INTERACTIONS					
AB	5,25918E7	5	1,05184E7	1,23	0,3529
RESIDUAL	1,02411E8	12	8,53422E6		
TOTAL (CORRECTED)	1,57853E9	23			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

Tabela 22 – comparação das médias obtidas na Anova, representadas no quadro anterior recorrendo ao teste de *Tukey*, para o elemento Titânio

Multiple Range Tests for Ti by Modalidade

Method: 95,0 percent Tukey HSD

Modalidade	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
TRATADO	12	16510,3	843,318	X
N TRATADO	12	19889,1	843,318	X

Contrast	Sig.	Difference	+/- Limits
N TRATADO - TRATADO	*	3378,78	2598,53

* denotes a statistically significant difference.

3.8 Variação do teor em metais após tratamento

Com o intuito de perceber se as diferenças nos elementos anteriormente analisados, apesar de estatisticamente comprovadas, poderiam ser ou não originadas pela correcção do defeito (com recurso ao sulfato de Cobre) feita no decorrer do ensaio. A figura 4 apresenta o teor de cobre após o tratamento. Como seria de esperar, observou-se um aumento significativo deste metal ao contrário do que aconteceu com o titânio e o sódio (figuras 5 e 6) que observaram variações divergentes do cobre. Indicando que estes dois elementos não são provenientes do produto adicionado (sulfato de cobre) como elementos contaminantes.

Figura 4 - Variação do teor de Cobre antes e após o tratamento.

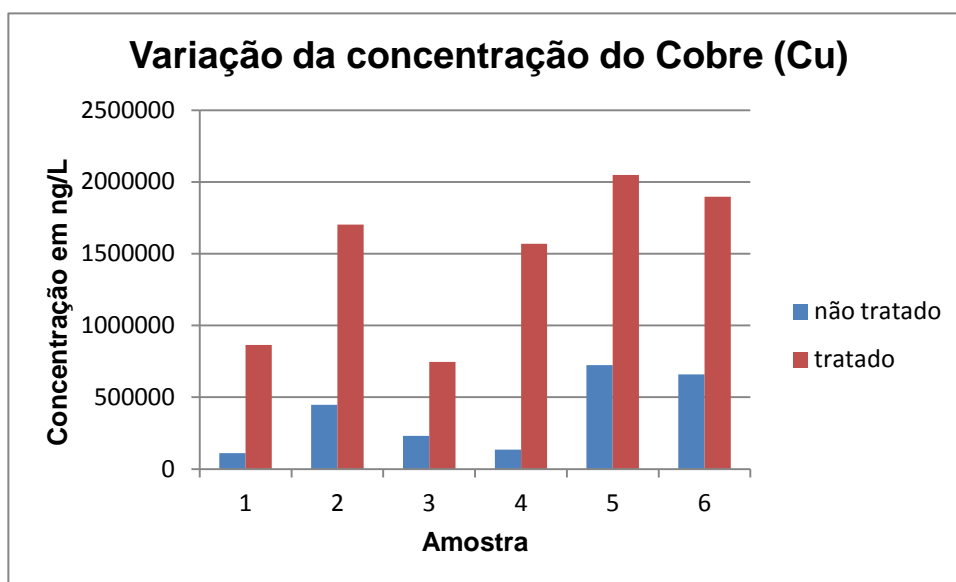


Figura 5 - Variação do teor de Titânio nas amostras, antes e após o tratamento.

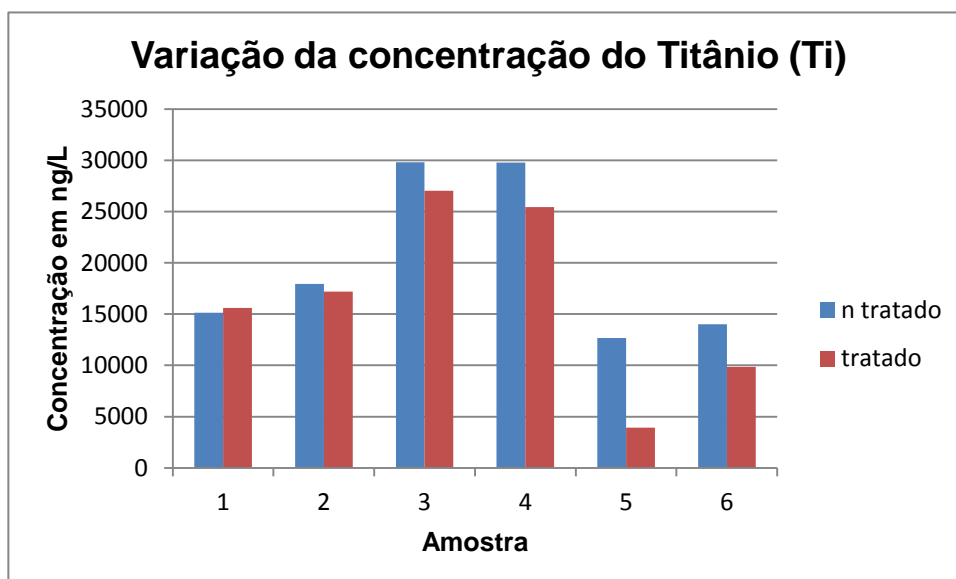
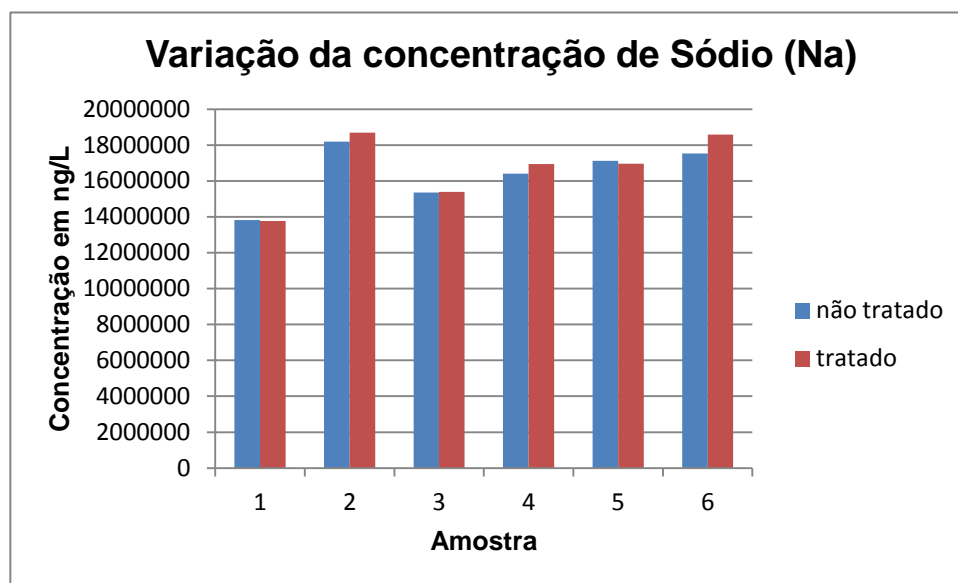


Figura 6 - Variação do teor de Sódio nas amostras, antes e após o tratamento.



3.9 Relação entre o cobre adicionado e o cobre do vinho após tratamento

Face à alteração do teor em cobre em função do tratamento das amostras, pretendeu-se quantificar qual o aumento no teor final devido ao cobre adicionado. Na tabela 23 estão apresentados os teores esperado em função da adição de cobre e a figura 7 reflecte a relação entre o teor de cobre adicionado e o determinado nos vinhos. Os resultados descritos na figura 8 demonstram que o teor determinado nos vinhos representa cerca de 85% do cobre adicionado.

Analisando o teor de cobre final nas amostras em estudo, constata-se que as amostras 2, 4, 5 e 6 possuem teores de cobre que excedem o limite legal de 1 mg/L. Nestes casos apesar de serem ensaios laboratoriais, que não reproduzem na integra a realidade dos acontecimentos em adega, o excesso de cobre é evidente. No entanto a experiência e análises provam que estes valores não são atingidos em adega. Em primeiro lugar porque se evita o uso de sulfato de cobre como solução, recorrendo a arejamento e outras técnicas para remover o defeito. Por outro lado o facto de existirem vinhos de lote, permite que a interacção entre os diferentes vinhos, bem como a operação de loteamento, faça com que o defeito desapareça naturalmente.

Tabela 23 – Quantidade de Cobre adicionado às amostras e a quantidade final obtida.

Amostra	Quantidade em µg/ L				Relação entre teor previsto e o final
	Cu Inicial	Cu adicionado	Cu final previsto	Cu final	
1	92	1148	1240	864	69,7%
2	497	1683	2180	1702	78,1%
3	307	765	1072	746	69,6%
4	138	2040	2178	1570	72,1%
5	777	1862	2639	2049	77,6%
6	656	1734	2390	1898	79,4%

Figura 7– Relação entre a quantidade final prevista de cobre após tratamento e a quantidade final real obtida.

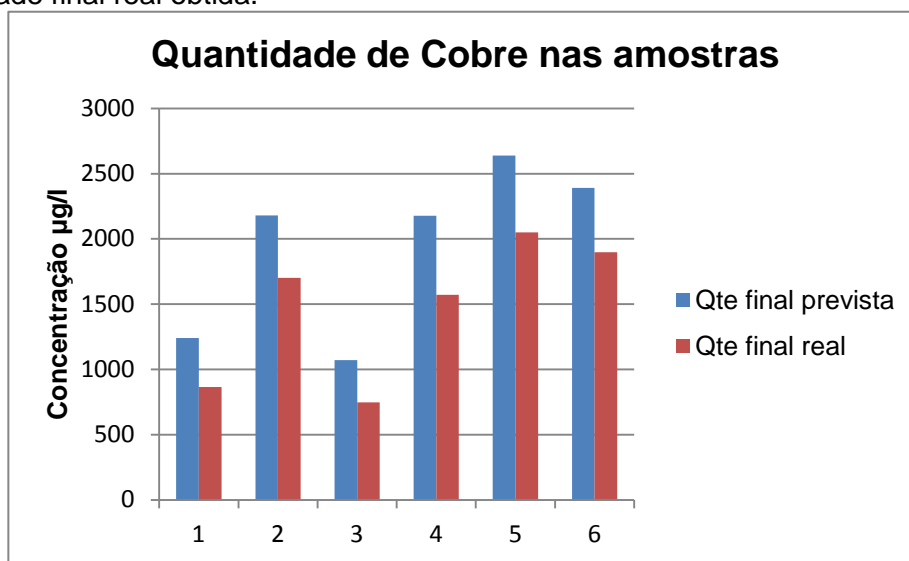
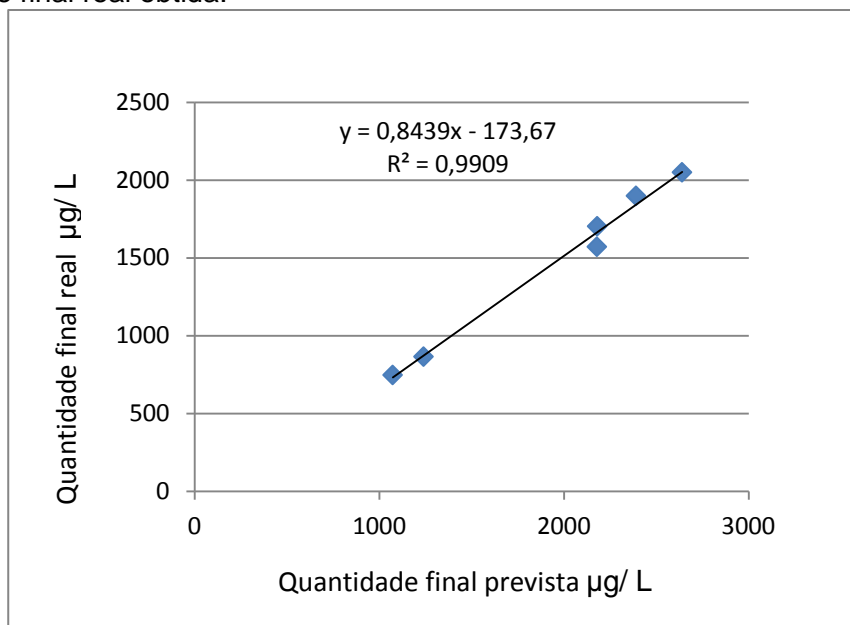


Figura 8 – Correlação entre a quantidade final prevista de cobre após tratamento e a quantidade final real obtida.



4. Conclusões finais e perspectivas futuras

A análise retrospectiva dos dados da empresa permitiu, de uma forma empírica, verificar uma eventual relação entre o tempo de fermentação e o início da vindima com a incidência do defeito a reduzido. Estes factores estarão relacionados com o desempenho fermentativo da levedura, que é um dado adquirido no aparecimento deste problema.

Assim, será possível verificar estas hipóteses no futuro, fermentando mostos com diferentes maturações e a diferentes temperaturas, como forma de variar o tempo de fermentação. Em complemento, seria interessante testar cubas de remontagem do tipo argelino, que permitem um arejamento mais intenso, ou testar remontagens com arejamento e micro-oxigenação, uma vez que as condições de fermentação na adega são redutoras.

A análise multi-elementar permitiu verificar que o tratamento com cobre não afectou a composição em metais de forma a impedir uma discriminação das amostras em função da origem. Considerando, que os vinhos provêm da mesma vinha, a diferença fundamental deve ser devida às castas utilizadas no lote dos vinhos.

O metal mais afectado com o ensaio foi o Cu, em consequência da adição do sulfato de cobre, mas não alterou a distinção entre as várias amostras. Tal facto deve-se à que o sulfato de cobre aumentou de forma proporcional entre as amostras não alterando as suas diferenças relativas. Assim, a aplicação de sulfato de cobre tendo em vista a resolução do problema do reduzido dos vinhos, não afecta o equilíbrio geral dos restantes elementos presentes no vinho, mantendo-se o poder discriminante da composição em metais. Ainda que, não provado cabalmente, os resultados obtidos parecem indicar que a susceptibilidade dos vinhos à redução não está relacionada com o teor de metais do vinho (ver introdução). De facto as amostras 3 e 4 apresentaram composição semelhantes mas a intensidade do tratamento variou entre a aplicação de 3 e 8 mg/l de sulfato de cobre. É possível que o efeito dos metais referido na introdução tenha apenas a ver com os metais introduzidos pelos tratamentos fitossanitários que podem afectar o desempenho das leveduras e não pelos metais naturais do mosto.

Do ponto de vista tecnológico, após resolver o problema da redução, importa diminuir o teor de cobre nos vinhos para valores que previnam a casse cuprosa e estejam abaixo dos limites legais. Assim, uma linha possível de investigação seria a avaliação de diferentes tratamentos (e. g. colagens, filtrações, decantação natural) na redução do teor em cobre e, concomitantemente, na composição em metais dos

vinhos como forma de avaliar a robustez deste parâmetro na distinção entre vinhos de diferentes origens.

5. Bibliografia

- Boulton, R., Singleton, V., Bisson, L., & Kunkee, R. (2002). *Teoría y práctica de la elaboración del vino*. Editorial ACRIBIA, S.A.(176,177,182,183).
- Catarino, S., Curvelo-Garcia, A., & Sousa, R. B. (2005). *Measurements of contaminant elements of wines by inductively coupled plasma-mass spectrometry: A comparison of two calibration approaches*. Elsevier.
- Flanzy, C. (2003). *Enología: Fundamentos Científicos y Tecnológicos*. A. Madrid Vicente, Ediciones; Ediciones Mundi-Prensa (153,154,155,281-283).
- Fugelsang, K. C., & Edwards, C. G. (2007). *Wine Microbiology Practical Applications and Procedures*. Springer Science + Business Media, LLC (23,128,129).
- Goode, J., & Harrop, S. (2008). *Wine Faults and their prevalence: Data from the world's largest blind tasting*. Lalleman (7-9).
- Jackson, R. S. (2008). *Wine Science Principles and Applications third edition*. Elsevier Inc (437,499-502).
- Linderholm, A. L., L.Dietzel, K., Hong, Y., Kumar, G. R., L.Findleton, C., & Bisson, L. F. (2008). *The Genetics of sulphide taint production in Saccharomyces*. Lallemand (11,12).
- Moreira, N., Mendes, F., Pereira, O., Pinho, P. G., Hogg, T., & Vasconcelos, I. (2002). *Volatile sulphur compounds in wines related to yeast metabolism and nitrogen composition of grape musts*. Elsevier (29, 38)
- Reynolds, A. G. (2010). *Managing wine quality vol 2: Oenology and wine quality*. Woodhead Publishing Limited.
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., & Dubourdieu, D. (2006). *Handbook Of Enology Vol 2 The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments 2nd Ed*. Jonh Wiley & Son, Ltd (216-219; 261-269)
- Trujillo, J. P., Conde, J. E., Pont, M. L., Câmara, J., & Marques, J. C. (2010). *Content in metallic ions of wines from the Madeira and Azores archipelagos*. Elsevier.
- Ugliano, M., Winter, G., Coulter, A., & Henschke, P. (2009). Practical management of hydrogen sulfide during fermentation – an update. *The Australian & New Zealand Grapegrower and Winemaker* , pp. 30-37.
- Zoecklein, B. (Julho/Agosto de 2008). HACCP Plan Check Sulfur- Like off odors. *PW Winery & Vineyard* .
- Zoecklein, B. W., Fugelsang, K. C., Gump, B. H., & Nury, F. S. (2001). *Análisis y producción de vino*. Editorial Acribia, S.A. (175-184; 509-511)
- Zoecklein, B. (Fevereiro de 2008). *Wine Business*. Obtido em Janeiro de 2011, de <http://www.winebusiness.com/wbm/?go=getArticle&dataId=54422>

Anexos

